

Einfluss naher Infrarotstrahlung auf die durch ionisierende Strahlung induzierten zellulären Veränderungen

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades

eines Doctor rerum naturalium

genehmigte Dissertation von

Dipl. Ing. Anja Heselich (FH)

aus Karl-Marx-Stadt

Berichterstatter: Prof. Dr. Paul G. Layer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Gerhard Thiel

Tag der Einreichung: 29.11.2011

Tag der mündlichen Prüfung: 31.01.2012

Darmstadt 2012

D 17

Danksagung

Ganz herzlich danken möchte ich Prof. Dr. Paul G. Layer für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können. Aber auch für die vielen guten Ratschläge und Motivationen und die Unterstützung im Ganzen, sowie Kritik zur richtigen Zeit, möchte ich mich bedanken.

Bei Prof. Dr. G. Thiel möchte ich mich für die spontane und bedingungslose Übernahme des Korreferats bedanken.

Auch bei vielen der hier ansässigen Arbeitsgruppen muss ich mich für experimentelle, und hin und wieder auch materielle Hilfe in den Etablierungsphasen bedanken. Das ist insbesondere die Arbeitsgruppe von Prof. Löbrich mit Steffen Naumann, Antonia Frohns und vielen weiteren zu nennen. Auch Manuela Mildner aus der Arbeitsgruppe von Prof. Cardoso gilt mein Dank für die Unterstützung bei Protein- und Antikörper-technischen Fragestellungen. Um die Liste nicht unendlich expandieren zu lassen bedanke ich mich an dieser Stelle bei allen, die ich zu den unpassendsten Zeiten mit unqualifizierten Fragen und Betteleien um Probematerial genervt habe.

Einen eigenen Absatz möchte ich Florian widmen, der immer offen für irgendwelche blödsinnig erscheinenden Ideen war und nicht ganz unbeteiligt an der Richtung die meine Arbeit genommen hat, war. Fairerweise muss man sagen, dass alles mit der Frage: „Du hast doch da diese hochmoderne Bestrahlungsapparatur....?“ begann. Nicht selten habe ich diesen Moment verflucht, wenn jeder Versuch zur Klärung des Phänomens nur noch mehr Fragen über Fragen und weitere unerklärliche Ereignisse nach sich gezogen hat. Aber alles hat ein Ende und so auch diese Arbeit – schön wär’s! Da ist noch viel zu tun bis dieses Thema fertig ist! Also gibt die Hoffnung auf, so schnell wirst du die nervtötende Stimme von links nicht los.

Danke auch an Toni für ihre Freundschaft, die Notfallversorgung mit pelzigen Mitbewohnern und gesundem Grün, und nicht zu vergessen dafür, dass du mich bei der Stange hältst.

Vielen Dank auch meinen Absolventinnen (ja, Männer haben wir nicht viel in der Biologie) Anke König, Lisa Schmidke und Dana Westmeier, die einen nicht unwesentlichen Teil am Vorankommen dieser Arbeit geleistet haben. Besonders Anke möchte ich hervorheben, die nicht nur eine clevere Diplomantin war, sondern mittlerweile auch eine super Freundin ist. Nicht unerwähnt bleiben dürfen Hannah und Silke, die mit ihrer Geselligkeit stets zur Verbesserung des Betriebsklimas beigetragen haben.

Ganz wichtig war vor allem aber die Unterstützung durch meine Familie. Meiner Mom muss ich schon allein dafür danken, dass sie mir das Studium ermöglicht hatte, durch das diese Arbeit überhaupt erst möglich gewesen ist. Aber auch generell wäre vieles ohne ihre Unterstützung in den letzten Jahren nicht möglich gewesen.

Meinen beiden Männern danke ich für gaaaaanz viel Geduld mit der gestressten Ehefrau und Mutter, für die Akzeptanz von Fastfood und Wochenendarbeit, überall rum liegenden Papern,

Entwürfen und sonstigem scheinbar unnützem Zeugs, die scheinbar unendliche Expansion des heimischen Zoos und vielem mehr. James muss ich danken, dass er die feindliche Übernahme seines Zimmers zum Zwecke der Etablierung eines Schreibbüros so widerstandslos hingenommen hat (wobei ich fürchte dies in Form einer Bedarfsliste für Star Wars Spielzeug noch in Rechnung gestellt zu bekommen). Tja und Ralf, das kann man gar nicht in Worte fassen was ich dir verdanke – also versuch ich es auch gar nicht. Ich werds dir einfach zeigen!

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	XI
1 Einleitung	1
1.1 Nahes Infrarot	1
1.2 Röntgenstrahlung	3
1.3 Mitotische Katastrophen	4
1.4 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)	6
1.5 Mitochondrien	8
1.6 Tumorsupressorprotein p53	11
1.7 Nek 1	13
1.8 MAPKinase Pathway	16
1.9 Poly-ADP-Ribosylierung, PARP und PARG	18
1.10 <i>Heat Shock</i> Proteine	20
1.11 Zielsetzung	22
2 Material und Methoden	24
2.1 Allgemeines Material	24
2.1.1 Geräte	24
2.1.2 Sonstige Verbrauchsmaterialien	25
2.1.3 Chemikalien	25
2.2 Material Zellkultur	27
2.2.1 Medien, Zusätze und Lösungen für die Zellkultur	27
2.2.2 Zelllinien	28
2.3 Material Immunhistochemie	29
2.3.1 Lösungen für Histochemie	29
2.3.2 Primäre Antikörper	29
2.3.3 Sekundäre Antikörper	30
2.3.4 FACS Reagenzien für AnnexinV Detektion	30
2.4 Material Molekularbiologie	31
2.4.1 Enzyme, sonstige Proteine, verwendete Kits	31
2.4.2 Primer	32
2.5 Material Proteinchemie	33
2.6 Zellkulturen	35

2.6.1	Kultivierung, Passage von NIH/3T3 Fibroblasten (murine embryonale Fibroblasten)	35
2.6.2	Kultivierung und Passage von R28 retinale precursor (rattus norvegicus)	35
2.6.3	Kultivierung und Passage von HaCaT (humane epidermale Keratinozyten)	36
2.6.4	Kryokonservierung und Auftauen von Zellkulturen	36
2.7	Primärkulturen	37
2.7.1	Präparation und <i>Ex-vivo</i> -Kultivierung von Mäusehaut, Stadium p0/p4	37
2.8	<i>In-vitro</i> -Bestrahlung von Zell- und Gewebekulturen	37
2.8.1	Bestrahlung mit nahem Infrarot (NIR) und Rotlicht	37
2.8.2	Bestrahlung mit Röntgenstrahlung	38
2.9	<i>In-vivo</i> -Bestrahlung von p0/p4-Mäusen mit NIR+Rotlicht.....	38
2.10	Wachstumskurven und Bestimmung der Indizes für Mitosen, Mitotische Katastrophen und Apoptosen	39
2.10.1	Wachstumskurven.....	39
2.10.2	Bestimmung Mitoseindex.....	39
2.10.3	Bestimmung Index mitotischer Katastrophen	39
2.10.4	Bestimmung Apoptoseindex.....	40
2.11	Immunhistochemische Färbungen.....	40
2.11.1	Antikörperfärbung	40
2.11.2	TUNEL-Färbung auf Cover Slips	40
2.11.3	DAPI-Färbung	41
2.11.4	Giemsa-Färbung.....	41
2.12	FACS Analysen	42
2.12.1	Zellzyklus	42
2.12.2	AnnexinV FACS Analysen.....	42
2.12.3	FACS Analysen reaktiver Sauerstoffspezies.....	42
2.12.4	FACS Analysen mitochondrialer Masse.....	42
2.13	Proteinchemische Analysen.....	43
2.13.1	Aufschluss und Konzentrationsbestimmungen.....	43
2.13.2	Western Blot	43
2.14	Molekularbiologische Methoden	44
2.14.1	RNA Isolation.....	44
2.14.2	cDNA Synthese	44
2.14.3	RT-PCR Analyse	45
2.15	Automatisierte Auswerteverfahren.....	46
2.15.1	Image Analyse von immunhistochemischen Färbungen	46
2.15.2	Image Analyse von Agarosegelelektrophese und Western Blot Analysen	46
2.16	Statistische Auswertung	46
3	Ergebnisse	47
3.1	Induktion Mitotischer Katastrophen durch NIR-Vorbehandlung	47

3.2	Strahleninduzierte Apoptose.....	50
3.3	Klonogenes Überleben	52
3.4	Einfluss naher Infrarotstrahlung auf Zellzyklus und Proliferation	53
3.4.1	Zellzyklus, mitotischer Index nach NIR	53
3.4.2	Zellzyklus, mitotischer Index nach Kombination von NIR mit Röntgen	54
3.4.3	Veränderung der Generationsdauer durch nahes Infrarot.....	55
3.4.4	Proliferation über BrdU-Aufnahmeraten.....	56
3.5	DNA Schädigung und Reparatur	59
3.6	Induktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)	61
3.7	Mitochondriale Masse	64
3.8	Westernblotanalysen möglicher Interaktionspartner der durch NIR potentiell beeinflussten Signalkaskaden.....	65
3.8.1	Expression und Aktivierung von p53	65
3.8.2	Expression der <i>never-in-mitosis-A (NIMA)-related</i> Kinase Nek1	66
3.8.3	Aktivierung der MAPKinase (Erk1/2)	67
3.9	RT-PCR-Analysen der <i>in-vivo</i> -Bestrahlung von Mäusen mit NIR	69
3.10	Aktivierung von <i>Heat Shock</i> Protein Expression durch NIR.....	71
4	Diskussion	72
4.1	Einfluss naher Infrarotstrahlung auf die Entstehung mitotischer Katastrophen und die Induktion der Apoptose	73
4.2	NIR beeinflusst Proliferation und DNA Reparatur in Röntgenbestrahlten Zellen.....	75
4.3	Einfluss der Induktion reaktiver Sauerstoffspezies auf die DNA-Reparatur und Entstehung mitotischer Katastrophen.....	77
4.4	Reaktive Sauerstoffspezies als Ursache für die gestörte Regulation des Zellzykluses	79
4.5	Interpretation der DNA-schadensassoziierten Ereignisse in Kontext mit den Studien aus den 50igern.....	80
4.6	Mechanistische Untersuchungen zur Klärung des Einflusses von NIR	83
4.6.1	Einfluss auf die Expression und Aktivierung von DNA-Reparatur assoziierten Proteinen.....	83
4.6.2	Einfluss von NIR auf die Phosphorylierung von Proteinen	89
4.6.3	Einfluss von NIR auf die Gap-Junction vermittelte Zell-Zell-Kommunikation....	93
4.7	Schlussfolgerung.....	94
5	Zusammenfassung.....	96
6	Anhang	XCVIII
6.1	Abbildungen zur Diskussion über den Einfluss von NIR auf die GAP-Junctions..	XCVIII

Literaturverzeichnis	XCIX
Publikationsliste	CXII
Lebenslauf	CXIII
Ehrenwörtliche Erklärung	CXV

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Elektromagnetisches Spektrum des Lichts.	1
Abbildung 2: Mitotische Katastrophen sind charakterisiert durch polynukleäre Kernmorphologien, welche nicht mehr den Kriterien für Mikrokerne, etabliert durch Fenech [17], entsprechen.....	4
Abbildung 3: Generation verschiedener ROS durch Energietransfer bzw. sequenzieller univalenter Reduktion von Triplett-Sauerstoff in der Zelle [Quelle: [35]].	6
Abbildung 4: ATP-Generierung über die oxidative Phosphorylierung im Mitochondrium.	10
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Interaktion des Tumorsuppressorproteins p53 mit der DNA.....	11
Abbildung 6: MAPKinase-Pathway. Wachstumsfaktoren binden am EGFR (<i>epidermal growth factor receptor</i>) und starten damit die Signalkaskade.....	17
Abbildung 7: APD-Ribose-Aufbau (Quelle: [110])	18
Abbildung 8: Bestrahlungsapparatur für nahes Infrarot (NIR).	38
Abbildung 9: Experimenteller Ablauf zur Bestimmung des Indizes mitotischer Katastrophen.	47
Abbildung 10: Vorbehandlung mit naher Infrarotstrahlung fördert die Entstehung mitotischer Katastrophen (MCs) 24 h nach Röntgenexposition.	48
Abbildung 11: Höhere Raten an mitotischen Katastrophen (MCs) durch Vorbehandlung mit nahem Infrarot verbleiben bis zu 72 h nach Röntgenbestrahlung.....	49
Abbildung 12: Experimenteller Ablauf zur Bestimmung der Apoptoseraten.	50
Abbildung 13: Nahe Infrarotstrahlung zeigt keinen Einfluss auf die Induktion von späten apoptotischen Ereignissen nach Röntgenbestrahlung.....	50
Abbildung 14: Vorbehandlung mit naher Infrarotstrahlung hat keinen Einfluss auf die durch Röntgenexposition induzierte frühe Apoptose.	51
Abbildung 15: Experimenteller Ablauf zur Bestimmung der Bcl2-Expression.	51
Abbildung 16: NIR Vorbehandlung bewirkt tendenziell eine Herunter-regulation der Bcl2-Expression.	52
Abbildung 17: Experimenteller Ablauf zur Bestimmung des klonogenen Überlebens.....	52

Abbildung 18: NIR-Vorbehandlung hat einen positiven Einfluss auf das klonogene Überleben in röntgenbestrahlten R28 retinalen Vorläuferzellen, jedoch keinen Einfluss in NIH/3T3.	53
Abbildung 19: Experimenteller Ablauf zur Bestimmung der Zellzyklusverteilung, sowie des mitotischen Index nach NIR.	53
Abbildung 20: NIR-Bestrahlung nimmt keinen Einfluss auf den Zellzyklus oder den mitotischen Index.	54
Abbildung 21: NIR-Vorbehandlung erhöht die Population an G2/M Zellen 24 h nach Röntgenexposition.	55
Abbildung 22: Experimenteller Ablauf zur Bestimmung der Wachstumskurven nach NIR Exposition.....	55
Abbildung 23: Bestrahlung mit nahem Infrarot führt zu einer Erhöhung der Verdoppelungszeit in den ersten 24 h.	56
Abbildung 24: Experimenteller Ablauf zur Bestimmung der BrdU-Aufnahmeraten nach Röntgen.....	56
Abbildung 25: NIR-Bestrahlung mit 360 kJ/qm wirkt der proliferations-hemmenden Wirkung von Röntgen-bestrahlung entgegen.	57
Abbildung 26: Experimenteller Ablauf zur Bestimmung der BrdU-Aufnahmeraten nach NIR.	58
Abbildung 27: Bestrahlung mit naher Infrarotstrahlung bewirkt eine dosisabhängige Hemmung der Proliferation in R28 retinalen Vorläuferzellen.	58
Abbildung 28: Experimenteller Ablauf zur Bestimmung der Induktion und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen anhand der Phosphorylierung des Histons H2AX	59
Abbildung 29: NIR-Vorbehandlung bewirkt eine erhöhte Persistenz von röntgeninduzierten DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB).	60
Abbildung 30: 24 h nach Röntgenexposition ist kein phosphoryliertes H2AX mehr nachweisbar.	61
Abbildung 31: Experimenteller Ablauf zur Bestimmung der Induktion reaktiver Sauerstoffspezies	61
Abbildung 32: Vorbehandlung mit NIR zeigt einen mehr als additiven Effekt auf den Level endogener reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) nach Röntgenexposition.	62
Abbildung 33: Experimenteller Ablauf zur Bestimmung der Generierung von ROS-induzierten 8-oxo-dG Addukten.....	63

Abbildung 34: Bestrahlung mit nahem Infrarot induziert vermehrt 8-oxo-dG-Addukte in R28 Zellen und bewirkt zudem eine Erhöhung der röntgeninduzierten Schäden.	63
Abbildung 35: Experimenteller Ablauf zur Bestimmung der mitochondrialen Masse	64
Abbildung 36: Bestrahlung mit nahem Infrarot erhöht die mitochondriale Masse sowohl in R28 retinalen Vorläuferzellen, als auch in 3T3 Fibroblasten.	64
Abbildung 37: Experimenteller Ablauf zur Bestimmung des Expressionslevels, sowie der Aktivierung von p53.....	65
Abbildung 38: NIR zeigt weder einen Einfluss auf die Expression noch auf die röntgeninduzierte Aktivierung von p53.	65
Abbildung 39: Experimenteller Ablauf zur Bestimmung des Expressionslevels von Nek1 nach NIR.....	66
Abbildung 40: NIR induziert eine erhöhte Expression von Nek1 in Fibroblasten.	66
Abbildung 41: Experimenteller Ablauf zur Bestimmung der Aktivierung der MAPKinase durch Phosphorylierung von Erk1 und Erk2.....	67
Abbildung 42: NIR hat keinen Einfluss auf die Aktivierung der MAPKinase (pErk1/2) 4 h nach Röntgenexposition.	67
Abbildung 43: Experimenteller Ablauf zur Bestimmung der Aktivierung der MAPKinase durch Phosphorylierung von Erk1 und Erk2, direkt nach NIR bzw. H ₂ O ₂	68
Abbildung 44: Bestrahlung mit NIR zeigt eine längere Aktivierung der MAPKinase (pErk1/2).	68
Abbildung 45: Bestrahlung mit nahem Infrarot führt zu erhöhter Expression von Nek1 in <i>in vivo</i> NIR-bestrahlten P4/P5-Mäusen.	69
Abbildung 46: Bestrahlung mit nahem Infrarot führt zu erhöhter Expression von PARG in <i>in vivo</i> NIR-bestrahlten P4/P5-Mäusen.	70
Abbildung 47: Bestrahlung mit nahem Infrarot zeigt eine tendenzielle Erhöhung der PARP-1 Expression in <i>in vivo</i> NIR-bestrahlten P4/P5-Mäusen.	70
Abbildung 48: Experimenteller Ablauf zur Bestimmung der Expressionslevel von Hsp27 und Hsp70 nach NIR.....	71
Abbildung 49: Bestrahlung mit nahem Infrarot bewirkt keine erhöhte Expression von HeatShock Proteinen.	71
Abbildung 50: NIR verstärkt die Gap-Junction vermittelte Zell-Zell-Kommunikation direkt und nach der Röntgenexposition.....	XCVIII

Abkürzungsverzeichnis

53BP1	<i>p53 binding protein 1</i>
8-oxo-dG	8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine
ADP	Adenosindiphosphat
AIF	<i>apoptosis inducing factor</i>
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>ataxia telangiectasia and Rad3 related</i>
BER	<i>base excision repair</i>
BrdU	Brom-Desoxyuridin (5-Brom-2'-desoxyuridin)
BSA	Bovines Serumalbumin
Cdk	Cyclin-abhängige Kinase (<i>Cyclin-dependent kinase</i>)
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
Chk1	Checkpointkinase 1
Chk2	Checkpointkinase 2
CLASP2	<i>cytoplasmic linker associated protein 2</i>
Cy2	Carbocyanin 2
Cy3	Carbocyanin 3
Da	Dalton (atomare Masseneinheit)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DCFDA	2',7'-Dichlorofluorescein Diacetat
DMEM	<i>Dulbecco 's modified Eagle's medium</i>
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DSB	Doppelstrangbruch (<i>double strand break</i>)
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinase</i>
eV	Elektronenvolt
FACS	Fluorescence associated cell sorting
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCS	Fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FEZ1	<i>fasciculation and elongation protein zeta-1</i>
FIR	fernes Infrarot
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase



Gy	Gray (Einheit der Strahlendosis)
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSF	<i>Heat Shock</i> Transkriptionsfaktoren
HSP	<i>Heat Shock</i> Proteine
kDa	kilo Dalton
MAPK	<i>mitogen activated protein kinases</i>
MC	mitotische Katastrophe (<i>mitotic catastrophe</i>)
MEK	<i>MAPK kinase</i>
MIR	mittleres Infrarot
MRE11	<i>meiotic recombination 11</i>
mtDNA	mitochondriale DNA
MTG	<i>MitoTraker[®] green</i>
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NEAA	Nicht essentielle Aminosäuren (<i>Non-essential amino acids</i>)
Nek1	<i>never-in-mitosis-A(NIMA)-related kinase 1</i>
NHEJ	<i>Non Homologous End Joining</i>
NIMA	<i>never-in-mitosis-A</i>
NIR	nahes Infrarot
p0	Postnatalstadium 0
PAR	Poly-ADP-Ribose
PARG	Poly-ADP-Riboseglycohydrolase
PARP	Poly-ADP-Ribosepolymerase
PBS	Phosphatgepufferte Saline (<i>phosphate buffered saline</i>)
PDT	photodynamische Therapie
PNK	Polynukleotid Kinase
Raf	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
Ras	<i>rat sarcoma</i>
RNA	Ribonucleinsäure
RNAse	Ribonuclease
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
rpm	Rotationen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion



Ser	Serin
shRNA	<i>short-hairpin RNA</i>
siRNA	<i>silencing RNA</i>
SOD	Superoxid Dismutase
SSBR	<i>single strand break repair</i>
tRNA	Transfer-RNA
TUNEL	<i>Terminale Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling</i>
U	Unit
UV	Ultraviolet
VDAC1	<i>voltage dependent anion channel 1</i>
XRCC1	<i>X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1</i>

1 Einleitung

1.1 Nahes Infrarot

Als Infrarotstrahlung (kurz IR-Strahlung) werden elektromagnetische Wellen im Spektralbereich zwischen sichtbarem Licht und den langwelligeren Mikrowellen bezeichnet (siehe Abbildung 1). Dies entspricht einem Wellenlängenbereich von etwa 780 nm bis 1 mm. Bei kurzwelliger IR-Strahlung (ab 780 nm) spricht man von nahem Infrarot (near infrared, NIR), bei Wellenlängen von ca. 5–25 Mikrometer von mittlerem Infrarot (mid infrared, MIR). Extrem langwellige IR-Strahlung (25 μm -1 mm) bezeichnet man als fernes Infrarot (far infrared, FIR). Sie grenzt an den Bereich der Terahertzstrahlung. Der nahe Infrarotbereich untergliedert sich zudem noch in Infrarot A-Strahlung (IR-A, 700 – 1.400 nm), IR-B (1.400 – 3.000 nm) und einen Teil des Infrarot-C-Bereiches (3.000 – 15.000 nm). Im Anschluss an den Infrarot-A-Bereich, ab ca. 1.450 nm, steigt die Absorption der Strahlung in Wasser stark an. Damit einhergehend erhöht sich mit steigender Wellenlänge auch die Wärmeinduktion in wasserhaltigen Substanzen und somit auch im Gewebe.

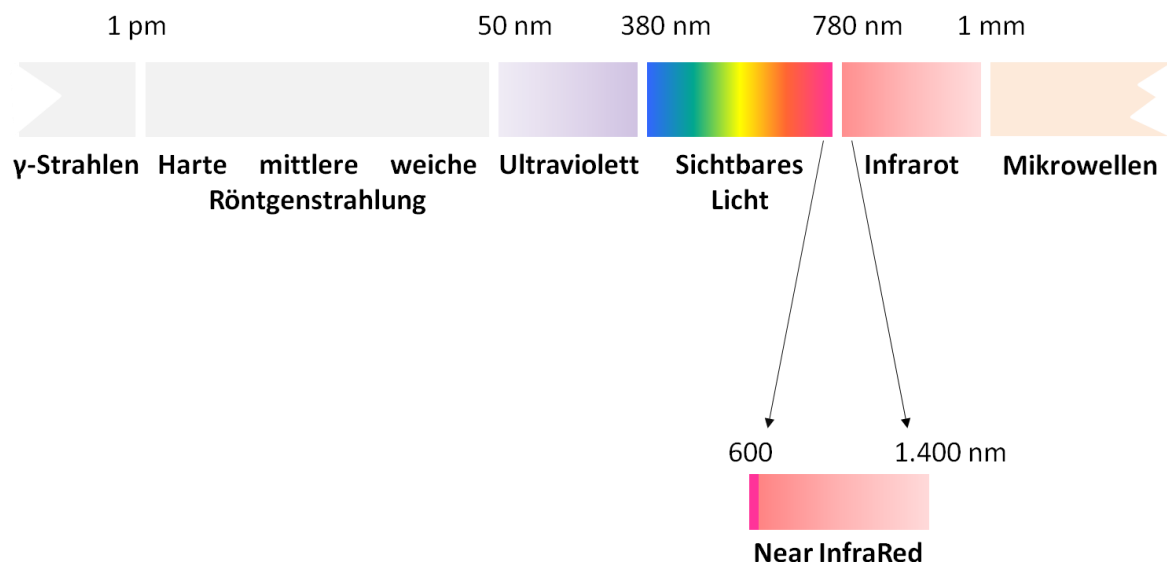


Abbildung 1: Elektromagnetisches Spektrum des Lichts. Im kurzwelligen Bereich befinden sich die ionisierenden Strahlungen; beginnend mit der Gamma-Strahlung weiter über die verschiedenen Röntgenhärten bis hin zum Ultravioletten Licht. Ab Wellenlängen im Bereich des UV-B Lichts sind keine direkten Ionisationseffekte mehr möglich. Im Anschluss an das Spektrum des sichtbaren Lichts befindet sich der längerwellige Infrarotbereich, der in den Bereich der Mikrowellenstrahlung mündet. Die in dieser Arbeit verwendeten Wellenlängen des nicht-thermischen nahen Infrarots schließen mit einem Wellenlängenbereich von 600-1.400 nm noch einen Teil des roten Lichts mit ein. (Quelle: [1])

Medizinisch relevant ist vor allem Infrarotstrahlung im nahen Infrarotbereich, wobei in der Regel hierzu additiv Wellenlängen aus dem Rotbereich appliziert werden. Die dabei eingesetzten Radiatoren emittieren dabei Wellenlängen von ca. 660 – 1.400 nm (siehe Abbildung 1); längere Wellenlängen werden über Adsorption in Wasser zurückgehalten. Diese spezifische, medizinisch eingesetzte Variante wird daher auch als wIR-A, sogenannte wassergefilterte IR A-Strahlung bezeichnet.

Biologische und medizinische Relevanz

Der Mensch ist ständig bewusst und unbewusst einer Exposition mit naher Infrarotstrahlung durch solare Strahlung, aber auch durch kommerzielle und medizinische Anwendungen, ausgesetzt. So beträgt der Anteil an naher Infrarotstrahlung der solaren Strahlung, welche bis zur Erdoberfläche gelangt, circa 49% [Quelle: ASTM G173-03, www.nrel.gov/rredc]. Daraus ergibt sich, dass Dosen wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden, bereits nach einem 15 bis 30 minütigem Sonnenbad, je nach Standort, erreicht sind (basierend auf dem Juni-Durchschnittswert der letzten 22-Jahre: 14 min Rom, Italien; 18 min New York, USA; 24 min Frankfurt, Deutschland; 30 min Sidney, Australien; Quelle: Atmospheric Science Data Center of NASA). Auch mit den therapeutischen Dosen der sogenannten LLLT, *low level light therapy*, zur Behandlung von Schädigungen in tieferen Gewebebereichen, welche im Bereich zwischen 100 und 500 kJ/qm liegen, sind die hier verwendeten Dosen vergleichbar [2].

Die Relevanz für therapeutische Zwecke bedingt sich vor allem daraus, dass nahe Infrarotstrahlung, gegebenenfalls einschließlich eines Rotlichtanteils, eine Vielzahl an biologischen Prozessen beeinflussen kann. Diese sind unter anderem eine verbesserte Wundheilung [3, 4], eine verstärkte Muskelregeneration [5] sowie auch der Schutz von neuronalen Zellen gegenüber Zytotoxinen [6].

In vitro Studien über die Wirkung naher Infrarotstrahlung zeigten unter anderem auch mitogene Effekte [7] sowie Einflüsse auf den mitochondrialen Metabolismus [8-10]. Sogar ein zeitabhängiger Einfluss von NIR auf die Balance zwischen pro- und anti-apoptotischer Proteinexpression in humanen Fibroblasten [11, 12], was diesen möglicherweise einen Schutz gegenüber UV-induzierter Zytotoxizität ermöglicht [7, 12], wurde beschrieben.

Jedoch wurden teilweise auch potentiell tumorfördernde Einflüsse, wie eine erhöhte Angiogenese [13] oder auch eine Erhöhung der Expression von MMP-1 und MMP-2, wobei letztere unter anderem mit der Metastasierung von Tumoren in Zusammenhang gebracht wird [13-15], beschrieben.

1.2 Röntgenstrahlung

Bei der, 1895 von Wilhelm C. Röntgen entdeckten, Röntgenstrahlung handelt es sich um hochenergetische Strahlung im Wellenlängenbereich von 50 nm bis unter 1 pm. Damit liegt sie im elektromagnetischen Spektrum zwischen der kurzwelligen UV-Strahlung und der Gammastrahlung. Röntgenstrahlung gehört zu den sogenannten ionisierenden Strahlungen. Trifft diese auf ein Atom oder ein Molekül, so schlägt sie bereits bei einer minimalen Photonenenergie von 124 eV ein oder mehrere Orbitalelektronen heraus, wodurch Ionen oder Radikale entstehen. Geschehen diese Ionisationsprozesse an zellulären Molekülen wie beispielsweise der DNA, so können die Schadensstellen im Folgenden weiter zu Einzel- oder Doppelstrangbrüchen prozessiert werden.

Die Dosis ionisierender Strahlung wird in der Regel in Gray (Gy) angegeben und beschreibt damit die Energie in Joule, die pro Kilogramm Materie absorbiert werden.

Biologische und medizinische Relevanz

Ionisierende Röntgenstrahlung wird in niedrigen Dosen für “diagnostische Radiographie” (1-10 mGy) und in hohen Dosen (fraktionierte Bestrahlung bis zu einer lokalen Gesamtdosis von bis zu 80 Gy) während der Strahlentherapie eingesetzt. Sie kann direkt mit den biochemischen Strukturen des Gewebes, wie den intrazellulären Proteinen, der DNA und weiteren Molekülen, interagieren. Zusätzlich kann sie aber auch indirekt Schäden über die Bildung freier Radikale induzieren, welche die Strukturintegrität von Proteinen und DNA zerstören, sowie andere kritische Elemente der Zelle schädigen können [16]. Damit einhergehend beeinflusst Röntgenstrahlung auch die Regulation von Zellzykluscheckpoints, die verantwortlich für den Eintritt in, und das Fortschreiten durch die Mitose sind.

Röntgenstrahlung, sowie alle ionisierenden Strahlenarten, können dank dieser Auswirkungen auf zelluläres Gewebe die Entstehung von Tumoren induzieren und fördern. Jedoch macht auch gerade diese Kapazität zur Zellschädigung ihre Funktionalität bei der Tumorthherapie aus. Der Erfolg einer Strahlentherapie hängt sehr stark vom Gleichgewicht zwischen applizierter Röntgendosis im tumorogenen Gewebe und der lokal genau begrenzten Applikation, und damit dem Schutz des umliegenden Gewebes, ab.

Jegliche unkontrollierbaren Randeffekte führen entweder zu einer ineffizienten Zerstörung der Tumorzellen oder einer schädigenden Wirkung des gesunden Nachbargewebes. Daher sind alle Parameter, welche die Effizienz einer Röntgentherapie in einer positiven oder negativen Weise beeinflussen können, von höchster klinischer Relevanz.

1.3 Mitotische Katastrophen

Nach Schädigung von eukaryotischen Zellen durch gentoxische Agentien, wie z.B. Röntgenstrahlung, sind bei ausreichend hohem Schaden nicht nur Apoptosen oder Nekrosen zu beobachten, sondern auch das Eintreten des terminalen Wachstumsstopps durch Seneszenz, sowie die sogenannten mitotischen Katastrophen (*mitotic catastrophes*, MC; siehe Abbildung 2).

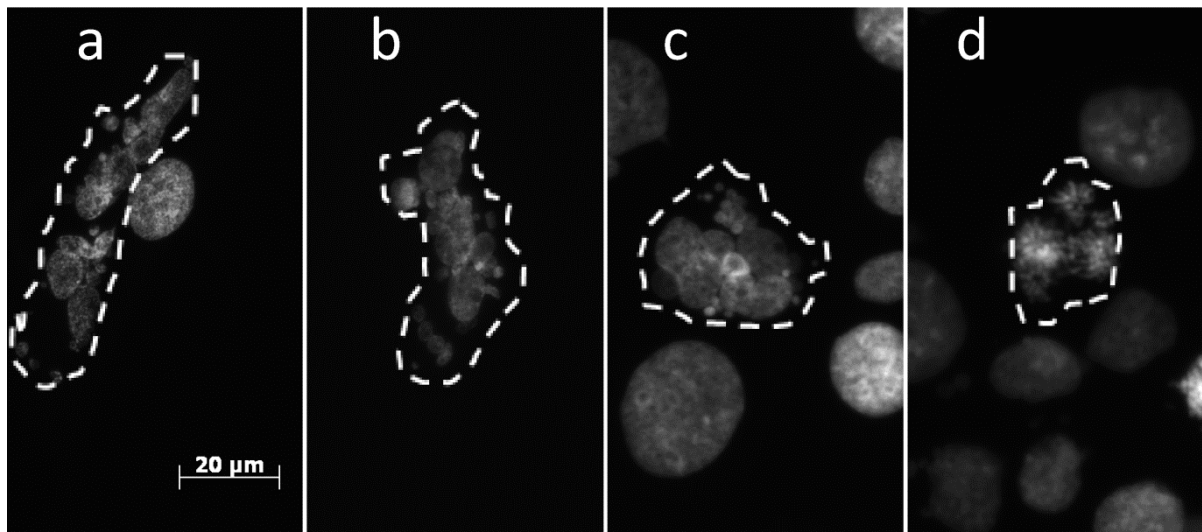


Abbildung 2: Mitotische Katastrophen sind charakterisiert durch polynukleäre Kernmorphologien, welche nicht mehr den Kriterien für Mikrokerne, etabliert durch Fenech [17], entsprechen. Die Rate der abgebildeten DAPI-gefärbten mitotischen Katastrophen (a-c in G-Phase; d in Metaphase; Zellumriss durch gestrichelte Linie markiert) wird als Endpunkt zum Nachweis genomischer Instabilität analysiert. Derartige mitotische Katastrophen entstehen aus aberranten Mitosen, aus welchen polynukleäre oder polyploide Zellen resultieren [18-22]. a,b: R28 retinale Vorläuferzellen, c,d: HaCaT humane Keratinozyten; Skalierung = 20 µm.

In der Literatur wird häufig bereits der Vorgang der aberranten Teilung als mitotische Katastrophe bezeichnet, die zu Tage tritt, wenn Zellen nach einem DNA-Schaden, meist einhergehend mit einem defekten Zellzykluscheckpoint, nicht mehr in der Lage sind, eine vollständige Mitose zu durchlaufen [23-25]. Teilweise irreführend dabei ist, dass ebenfalls die daraus resultierende Zellmorphologie als mitotische Katastrophe bezeichnet wird.

Per Definition wird die mitotische Katastrophe im Allgemeinen als Variante des proliferativen Zelltodes beschrieben, welche aus entarteten Mitosen entsteht und zur Bildung polynukleärer Zellen, mit einer Vielzahl an Zell- und Mikrokernen mit teilweise dekondensiertem Chromatin und einem aneu- bzw. polyploiden Chromosomensatz, führt [18-21, 26-30].

Bereits Castedo et al. [23] stellten in einem Review über mitotische Katastrophen die These auf, dass diese durch eine Kombination aus der fehlerhaften, oder sogar ausbleibenden, Aktivierung von Zellzykluscheckpoints und einem Auftreten zellulärer Schäden verursacht werden. Schlägt die Arretierung des Zellzykluses an den DNA-Struktur- und Spindel-Checkpoints vor, oder während der Mitose fehl, löst dies eine fehlerhafte Chromosomensegregation aus, welche schlussendlich in der Aktivierung apoptotischer Default-Pathways und damit einhergehend dem zellulären Tod endet.

Den molekularen Zusammenhang zwischen einer mitotischen Katastrophe und einer Apoptose stellen Castedo et al. über die Aktivierung von Caspasen und die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran, und damit einhergehend die Freisetzung von proapoptotischen Faktoren wie AIF (*apoptosis inducing factor*) und Cytochrom C, welches wiederum Caspase-3 und -9 aktiviert, her. Selbst bei einer unvollständigen morphologischen Veränderung der Zelle und des Zellkerns, wie sie in der Apoptose beschrieben wird, initiiert die Aktivierung und Freisetzung dieser Faktoren zunächst die Caspase-abhängigen proapoptotischen Signalkaskaden. Sind die Zellen nicht mehr in der Lage, das apoptotische Programm vollständig zu durchlaufen und gehen dann in die Mitose, so werden diese sich im darauf folgenden Zellzyklus sehr wahrscheinlich asymmetrisch teilen und so aneuploide Zellen generieren [23].

Interessanterweise sind Caspase-Inhibitoren nicht in der Lage, das Auftreten von potentiell sterbenden multinukleären Zellen bzw. Zellen mit stark vergrößertem Zellkern zu verhindern. Dies veranlasste Nabha et al. [31] zunächst zu der Schlussfolgerung, dass die mitotische Katastrophe in keinem Zusammenhang mit der Apoptose steht. Mit dem Nachweis der Caspase-unabhängigen Apoptose [23, 32, 33] wurde jedoch klar, dass dies nicht als Beweis ausreichend ist. So wäre durchaus ein Zusammenhang über einen Caspase-unabhängigen Signalweg denkbar.

Die Generierung von mitotischen Katastrophen, welche in der Regel nicht mehr teilungsfähig sind, könnte laut Castedo et al. einen Mechanismus darstellen, welcher Aneuploidisation verhindert und so möglicherweise auch eine Rolle in der Oncogenese spielt [23].

Dem entgegen stehen neuere Studien von Ianzini und Erenpreisa, die zeigen, dass mitotische Katastrophen durchaus in der Lage sind, viable Tochterzellen hervorzubringen. Es zeigte sich, dass derartig entartete Zellen mit ungeschädigten Nachbarzellen fusionieren und deren Spindelapparat für eine Art Reduktionsteilung, ähnlich der Meiose, nutzen. Dabei werden

viable Tochterzellen mit einer entarteten genomischen Neukomposition generiert, welche wieder über normale Mitose proliferieren können.

Derartige Depolyploidisationen können auch in soliden und zirkulierenden Tumoren beobachtet werden [34]. Dies lässt vermuten, dass solche Mechanismen zur Tumorprogression beitragen, und zur Resistenz gegenüber deren Behandlung *in vivo* führen können [19].

1.4 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Der Begriff „Reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS)“ fasst eine Vielzahl von Molekülen und freien Radikalen, die aus molekularem Sauerstoff entstehen können, zusammen. Außer dem wohl bekanntesten ROS-Vertreter, dem Singulett-Sauerstoff, gehören dazu noch diverse Zwischenprodukte, die bei der Reduktion des Sauerstoffes zu Wasser entstehen (siehe Abbildung 3). Diese sind unter anderem Hyperoxidanionen-Radikale ($\text{O}_2^{\bullet-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxyl-Radikale (OH^\bullet). Außerdem treten auch Peroxylradikale (ROO^\bullet) und Alkoxyradikale (RO^\bullet) aus Lipiden auf.

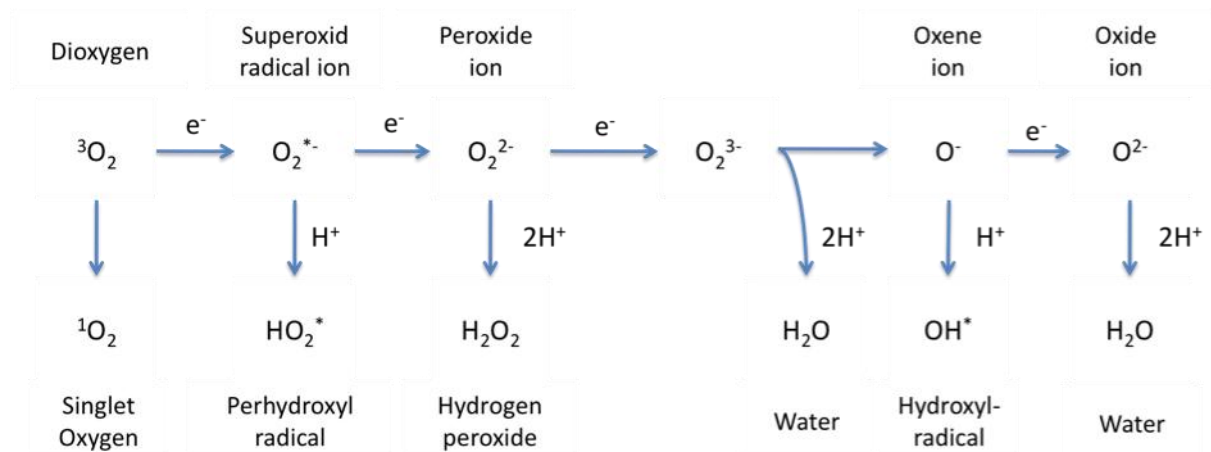


Abbildung 3: Generation verschiedener ROS durch Energietransfer bzw. sequenzieller univalenter Reduktion von Triplett-Sauerstoff in der Zelle [Quelle: [35]].

Molekularer Sauerstoff ist im Grundzustand ein Bi-Radikal im sogenannten Triplett-Zustand mit zwei ungepaarten Elektronen in der äußeren Hülle. Da sich zwei Elektronen im gleichen Spin-Zustand befinden, kann der Sauerstoff nur mit einem Elektron gleichzeitig reagieren und ist daher in der Doppelbindung mit den beiden Elektronen nicht sehr reaktiv. Andererseits, wenn eines der beiden ungepaarten Elektronen angeregt wird und seinen Spin-Zustand verändert, so ist die resultierende Spezies, der sogenannte Singulett-Sauerstoff ein

hochreaktives Oxidans, da bei beiden Elektronen in entgegen gesetzten Spins diese sehr schnell mit anderen Elektronenpaaren, insbesondere mit Doppelbindungen reagieren können. Radikale können durch homolytische Bindungsspaltungen zwischen zwei Atomen ähnlicher Elektronegativität wie O-O oder O-N Bindungen entstehen. Eine andere Möglichkeit sind Ein-Elektron-Oxidationen oder –Reduktionen von Atomen oder Molekülen wie auch bei Entstehung der Superoxidanionen ($O_2^{\cdot-}$). Dieses ist der Vorläufer vieler ROS-Derivate und zudem ein Mediator in der oxidativen Elektronentransportkette [36]. So wird zum Beispiel auch Wasserstoffperoxid (H_2O_2) spontan, oder über Superoxid-Dismutasen, aus Superoxidanionen generiert. Dieses wird weiter zu Wasser reduziert. Verläuft diese Katalyse unvollständig, so entsteht häufig das hochreaktive Hydroxylradikal (OH^{\cdot}), welches eines der stärksten natürlichen Oxidantien darstellt [35, 37].

Reaktive Sauerstoffspezies entstehen endogen über metabolische Prozesse, oder aber auch durch exogene Einflüsse wie UV-Strahlung. Endogene reaktive Sauerstoffspezies entstehen vorrangig in den Mitochondrien an den Komplexen der Atmungskette. Hauptverantwortlich dabei sind die Prozesse an Komplex I, der NADH-Dehydrogenase, sowie an Komplex III, der Cytochrom-C-Reduktase. Dieser Prozess läuft in 2-4% nur fehlerhaft ab und bewirkt daher dabei die Freisetzung nicht abreagierter ROS ins Zytoplasma [38]. In der inneren Membran der Mitochondrien erfolgt der Protonentransport entlang der Elektronentransportkette und endet mit der Bildung von ATP. Die Elektronentransportkette leitet die Elektronen entlang der beteiligten Komplexmoleküle, bis sie auf Sauerstoffatome übertragen, mit Protonen zu Wasser reduziert und damit neutralisiert werden. Teilweise entsteht jedoch statt des Wassers, ein Superoxidanion, welches ein zusätzliches Elektron aus den umgebenden Molekülen übernimmt und so zur Schädigung der mitochondrialen DNA oder mitochondrialer Proteine führt. Treten solche Ereignisse gehäuft auf, gerät die Zelle mehr und mehr unter oxidativen Stress und leitet schlussendlich die Apoptose ein [39].

Die Zellen besitzen jedoch eine Reihe an Abwehrmechanismen um einer Schädigung durch ROS entgegenwirken. Die Enzyme Superoxid-Dismutase, Glutathion-Peroxidase sowie Reduktase spielen dabei eine wichtige Rolle. Die Superoxid-Dismutase (SOD) ist sowohl im Zytoplasma als auch in den Mitochondrien vorhanden. Die Neutralisation von Superoxidanionen erfolgt über mehrere Enzyme. Aus zwei Superoxidanionen katalysiert zunächst die SOD ein Molekül Wasserstoffperoxid. Mit diesem kann die Katalase unter Bildung von Wasser und Sauerstoff reagieren. Die Glutathionperoxidase reduziert Wasserstoffperoxid unter gleichzeitiger Oxidation von Glutathion. Dieser Prozess macht auch

die Bedeutung von Glutathion als endogenes Antioxidans aus [38, 40]. Generell sind Antioxidanzien, wie Vitamin A, C und E, oder auch Polyphenole essentiell für antioxidativen Metabolismus [41, 42].

1.5 Mitochondrien

Mitochondrien sind membranumschlossene Organellen der Eukaryonten. Visuell wurden sie erstmals Mitte des 19. Jahrhunderts nachgewiesen. Zunächst galt jedoch der von Altmann geprägte Begriff *Bioplasten*. Die bis heute gültige Bezeichnung *Mitochondrium* wurde 1898 von Bender eingeführt [43].

Der Aufbau der Mitochondrien ist im Grundprinzip immer gleich. Die äußere Mitochondrienmembran grenzt das Organell vom Zytoplasma ab. Zusammen mit der inneren Mitochondrienmembran schließen sie den circa 8 nm breiten Intermembranraum ein. Im Inneren des Mitochondriums befindet sich die mitochondriale Matrix, in der sich auch die mitochondriale DNA befindet.

Die innere Membran stülpt sich mehrfach in den Innenraum des Mitochondriums und bildet so die sogenannten Cristae. Je nach Morphologie werden die eher flachen, scheibenförmigen Einstülpungen Cristae genannt, und die eher fingerförmigen als Tubuli bezeichnet. Ein Großteil der mitochondrialen Aktivität findet an dieser inneren Membran statt. Daher gilt auch: je höher die physiologische Aktivität der Zelle, desto dichter gepackt sind die Cristae.

Interessanterweise zeigen die beiden Membranen eine unterschiedliche Permeabilität. Während auch größere Metabolite die äußere Membran, dank des kanalbildenden Porins, passieren können, ist die innere Membran nahezu impermeabel. Der transmembranale Transport ist in der inneren Membran daher von Translokatoren abhängig [44].

Wie bereits erwähnt, besitzen Mitochondrien ihr eigenes Erbgut, die mitochondriale DNA (mtDNA). In humanen Mitochondrien finden sich 5 bis 10 identische, zirkuläre mtDNA-Moleküle mit je 16.569 Basenpaaren welche für 37 Gene codieren. Diese sind u.a. die ribosomale RNA (rRNA), die Transfer-RNA (tRNA) sowie 13 Polypeptide, die Bestandteil der Proteinkomplexe der inneren Mitochondrienmembran sind und einen Teil der Komplexe I, III, IV und V bilden. Die weiteren Bestandteile dieser Proteinkomplexe sind nukleär codiert, werden im Zytoplasma synthetisiert und aus diesem in die Mitochondrien transportiert.

Interessanterweise wird die mtDNA ausschließlich maternal vererbt, da die Mitochondrien des Spermiums bei der Befruchtung der Eizelle nicht in diese mit gelangen [45].

Mittlerweile sind Mutationen der mitochondrialen DNA als Ursache diverser Erkrankungen identifiziert worden. Die Auswirkungen mitochondrial assoziierter Erkrankungen können stark variieren, von einer leichten Bewegungsintoleranz [46] bis hin zu letalem Verlauf. Beispiele für derartige Erkrankungen sind die mitochondriale Myopathie [47, 48], die Leber Hereditäre Optik-Neuropathie (LHON) [49], das Leigh Syndrom [50]; NARP (Neuropathie/Ataxia/Retinis Pigmentosa) [51] und die mitochondriale Neurogastrointestinale Enzephalopathie (MNGIE) [52].

In der Zelle haben die Mitochondrien mehrere Funktionen. Ihre wohl wichtigste Aufgabe ist die ATP-Herstellung und damit Energiegewinnung für die Zelle. Jedoch sind sie auch an der Aktivierung diverser, meist Stress-induzierter, Signalkaskaden wie auch der Induktion der Apoptose beteiligt. Zudem sind sie an der Regulation des zytoplasmatischen und mitochondrialen Calciumgehaltes beteiligt [53].

Die Generierung von ATP als Reduktionsäquivalent verläuft über die schrittweise Oxidation von Pyruvat und NADH entlang mehrerer, in der inneren Mitochondrienmembran gelagerter, Komplexe. Sowohl das Pyruvat, als auch das NADH entstehen während der Glycolyse im Zytoplasma. In die innere Mitochondrienmembran sind die fünf, für die ATP-Produktion essentiellen, Komplexe NADH Dehydrogenase (Komplex I), Succinat Dehydrogenase (Komplex II), Cytochrom-C-Reduktase (Komplex III, bzw. Cytochrome-b-c1-Komplex), Cytochrom-C-Oxidase (Komplex IV) und ATP Synthase (Komplex V) eingelagert. Komplex I, III und IV sind Bestandteil der Elektronentransportkette, bei der die Elektronen von NADH und FADH_2 entlang dieser Kette weitergereicht werden. Sie generieren so einen, für die Herstellung von ATP an Komplex V essentiellen, Protonengradienten durch Aktivierung der Protonenpumpen, die diese aus der Matrix in den Intermembranraum pumpen.

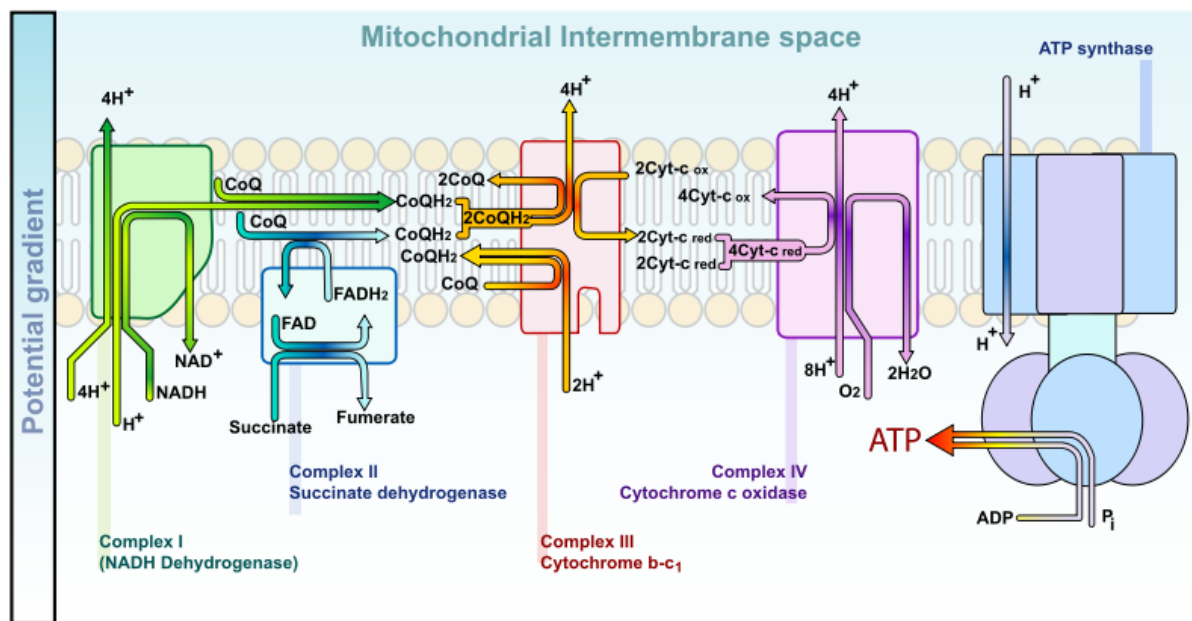


Abbildung 4: ATP-Generierung über die oxidative Phosphorylierung im Mitochondrium. Beginnend bei Komplex I (NADH Dehydrogenase) wird NADH zu NAD⁺ oxidiert und die freigesetzten Elektronen über CoenzymQ auf Komplex III (Cytochrom-c-Reduktase) übertragen. An Komplex II (Succinat-Dehydrogenase) wird Succinat zu Fumarat oxidiert und die freigesetzten Elektronen werden ebenfalls von CoenzymQ auf Komplex III übertragen. An diesem wird Cytochrom c reduziert und die Elektronen somit schrittweise auf dieses übertragen. Komplex IV (Cytochrom-c-Oxidase) übernimmt die Elektronen des reduzierten Cytochrom c und reduziert dabei Sauerstoff zu Wasser. An Komplex I, III und IV werden jeweils Protonen in den Intermembranraum des Mitochondriums gepumpt. Der so aufgebaute Protonengradient wird schließlich von der ATP-Synthase durch Zurückpumpen bei gleichzeitiger Gewinnung von ATP aus ADP und Phosphor, ausgeglichen [Quelle, Abbildung: Wikimedia Commons; CREATIVE COMMONS PUBLIC LICENSE-Lizenz].

Wirkt endogener oder exogener Stress auf die Zelle, und damit auch die Mitochondrien, ein, so können diese über den retrograd-mitochondrialen Signalweg mit dem Nukleus kommunizieren. Sie erwirken dabei die Adaptation der Expressionslevel verschiedener Gene, welche wiederum nach der Translation als Proteine diverse Signalkaskaden entsprechend der Notwendigkeit induzieren, blockieren oder auch regulieren können. Diesem Signalweg scheint, vor allem auch in Bezug auf oxidativen Stress, der auf die Zelle einwirkt, eine wichtige Rolle zu zukommen [54-56].

1.6 Tumorsuppressorprotein p53

Eines der wohl bekanntesten Tumorsuppressorproteine ist das Protein p53. Das zugehörige, codierende Gen *TP53* findet sich auf Chromosom 17, Genlocus p13.1 (*homo sapiens*; NCBI, Gene ID: 7157). Bei p53 handelt es sich um ein Sequenz-spezifisches DNA-Bindeprotein (siehe Abbildung 5), welches zudem als stressaktivierter Transkriptionsfaktor fungieren kann. Als solches kontrolliert es die Expression hunderter Gene, welche wiederum für die Regulation physiologischer Reaktionen der Zelle auf Veränderungen, eine wichtige Rolle spielen. Hierzu gehören das Auftreten genomischer Instabilität, Infektionen durch Viren und damit einhergehender Interferonproduktion [57, 58], DNA-Schäden [59] oder auch durch Hypoxie oder Zytokine ausgelöster metabolischer Stress [60]. In normalen Wildtypzellen ist das Expressionslevel von p53 niedrig, wogegen in einer Vielzahl von transformierten Zelllinien ein erhöhtes Expressionslevel zu verzeichnen ist, was auch Ursache für die Vermutung ist, dass p53 bei Transformation und Malignität eine große Rolle spielt [61].

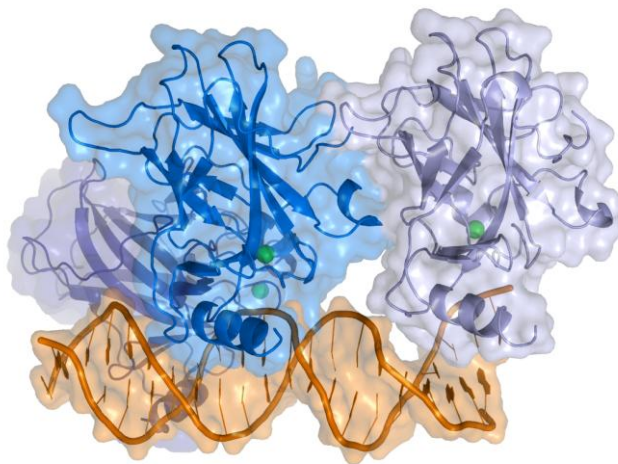


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Interaktion des Tumorsuppressorproteins p53 mit der DNA. Die p53 Proteine (blau, bzw. grau dargestellt) binden an einen Teilabschnitt der DNA (orange). [Quelle: T. Splettstoesser, in Anlehnung an Cho et al. Science 265 pp. 346; CREATIVE COMMONS PUBLIC LICENSE-Lizenz]

Ein Großteil der Genprodukte, deren Expression durch die Einwirkung von p53 induziert wird, koordiniert vor allem Reparaturprozesse. Dazu gehören der Abbau geschädigter Proteine, die DNA-Reparatur [62], die Herstellung von ATP über den Prozess der oxidativen Phosphorylierung [63], wie auch einige organellspezifische Funktionen wie die Aktivierung der Autophagie-Signalkaskade [64], mitochondriale Funktionen [65], Zellzyklus [62] und nicht zuletzt auch der Zelltod [65-67].

Auf zellulärer Ebene, auch im Hinblick auf die Grundlagenforschung zur DNA-Reparatur, sind vor allem die Fähigkeit zur Regulation des Zellzykluses [68], sowie zur Aktivierung von Reparaturproteinen nach einem induzierten DNA-Schaden [62] von Bedeutung. Nach Erkennung eines DNA-Schadens induziert p53 während der Reparatur einen Zellzyklusstop am G1/S-Checkpoint [69]. Diese Zellzyklusregulation durch p53 erfolgt über die Expression von p21. In der Zelle bindet p53 dabei an die DNA und stimuliert die Expression von p21, welches dann mit cdk2 (*cell division stimulation protein 2*) interagiert. Komplexiert p21 mit cdk2, so kann die Zelle nicht mehr im Zellzyklus fortschreiten [70]. Dieser Arrest wird aufrecht erhalten, bis die DNA-Reparatur abgeschlossen ist. Ist der Schaden zu hoch und die Reparatur nicht mehr möglich, so wird die Apoptose, ebenfalls unter Mitwirkung von p53, induziert [62]. Liegt nun eine funktionelle Mutation von p53 vor, welche die effektive Bindung des Proteins an die DNA stört, so wird die Expression von p21 nicht aktiviert. Das notwendige Stop-Signal für die Zellzyklusregulation fehlt, und es kommt zur unkontrollierten Proliferation der Zelle und damit einhergehend zur potentiellen Tumorentstehung [71].

Letztendlich dient diese stressinduzierte, transkriptionsbasierte Neuprogrammierung der Zelle durch p53, dem Erhalt der Zell- und Gewebeintegrität und damit einhergehend natürlich der Gesundheit und Überlebensfähigkeit des Organismus [67]. Gerade aber die Vielzahl an Funktionen, die p53 im Organismus übernimmt, ist auch verantwortlich für das große Potential zur Tumorigenese im Falle einer Mutation gerade dieses Proteins. In den meisten Tumorarten ist daher auch eine solche Mutation von p53 nachweisbar [71]. So wurde ein Zusammenhang mit einer Veränderung im p53-codierenden Gen *TP53* und in p16-codierenden Gen *CDKN2A* (CDK(*cyclin dependent kinase*)-Inhibitor 2A) bei der prämaligen Vorstufe des oesophagealen Adenocarcinoms, dem sogenannten Barretts Oesophagus, beschrieben. Diese Mutationen führen schlussendlich zu Aneuploidien und weiter zur Tumorigenese [72].

Meist reicht bereits die Mutation in einer der beiden vererbten Kopien von *TP53* aus, um die Prädisposition für die Generierung eines Tumors stark zu erhöhen. Dies ist zum Beispiel der Fall beim autosomal-dominant vererbten Li-Fraumeni-Syndrom [73]. Auch hier liegt eine Mutation im, für p53 codierenden Gen *TP-53* vor. Das Risiko bei dieser Mutation, an Krebs zu erkranken, liegt bei 50%, im Gegensatz zu einer Wahrscheinlichkeit von 1% in der Gesamtbevölkerung [74]. Dabei gilt es zu beachten, dass die Prädisposition nicht für eine spezifische Art an Tumor vorliegt, sondern vielmehr verschiedenste Tumore, häufig sogar eine Kombination mehrerer Typen, entstehen können [75].

1.7 Nek 1

Nek1 gehört zur Familie der *never-in-mitosis-A (NIMA)-related* Kinasen, welche gemeinsam mit den Familien der Polo- und Aurora-Kinasen für die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität der Zelle verantwortlich sind [76]. Bisher wurden 11 Isoformen der *NIMA-related* Kinasen, Nek 1-11, in Mammaliern identifiziert [77]. Nek1 ist eine Serin/Threonin-Kinase, welche die OH-Gruppen der entsprechenden Aminosäuren, aber auch von Tyrosin, phosphoryliert und die zugehörigen Proteine damit aktiviert [78].

Bereits 1992 entdeckten Letwin et al. *nek1* als murines Homolog zu *nimA* [78]. Das *nimA*-Gen, welches ursprünglich in *A. nidulans* von Oakley and Morris [79] beschrieben wurde, codiert für die Proteinkinase NIMA. Ihren Namen *never-in-mitosis-kinase-A* erhielt sie, da Zellen von *A. nidulans* mit fehlerhaftem *nimA*-Gen nicht in die Mitose eintraten. So zeigt sich auch die Bedeutung von NIMA für die Mitose in ihrer Aktivität. In Zellen, die sich aktiv im Zellzyklus befinden, ist eine erhöhte Aktivität von NIMA zu verzeichnen, welche ihr Maximum während der Mitose erreicht [80]. Eine funktionelle NIMA ist besonders für die Initiation der Mitose, als auch für die Organisation der Spindel wichtig [80, 81]. Das murine Nek1, sowie auch die meisten anderen der 11 Isoformen, zeigen eine 42%ige Homologie zu NIMA aus *A. nidulans* innerhalb der Kinase-Domänen. Bereits diese Homologie wies darauf hin, dass möglicherweise nicht nur ähnliche Substratspezifitäten, sondern auch ähnliche biochemische Funktionen von Nek1 zu erwarten waren.

Zunächst wurde Nek1 mittels *in situ*-Hybridisierung in den Keimbahnzellen der Maus, unabhängig vom Geschlecht nachgewiesen. Deutlich erhöhte Level stellten Letwin et al. auch während der Phasen der Meiose fest, was deutlich darauf hinwies, dass Nek1 bei dieser eine wichtige Rolle spielt [78]. Zudem stellten sie fest, dass in einigen Zelltypen die mRNA-Expression von *nek1* in direkter Korrelation mit der Proliferation stand. Da jedoch wiederum andere Zelltypen kaum oder keinen Zusammenhang zwischen dem Expressionslevel von *nek1* und der Proliferation erkennen ließen, vermuteten die Autoren, dass ein Grundlevel an Nek1 stets vorhanden sein muss und dessen Aktivität über posttranslationale Modifikationen geregelt wird [78].

In späteren *yeast-two-hybrid*-Analysen wurden bei der Suche nach Interaktionspartnern von Nek1, interessanterweise für die DNA-Schadensantwort wichtige Proteine wie 53BP1 (*p53 binding protein 1*; [82]) oder auch MRE11 (*meiotic recombination 11*; [83]) identifiziert.

Einige Jahre später stellten Polci et al. einen Zusammenhang zwischen Nek1 und der DNA-Schadensantwort nach ionisierender Bestrahlung in humanen und murinen Zellen fest. So zeigte sich, dass nach Induktion von Schäden durch ionisierende Bestrahlung die Kinase-Aktivität von Nek1 innerhalb kürzester Zeit stark ansteigt, gefolgt von einer zeitverzögerten erhöhten Expression des *nek1*-mRNA-Niveaus. Zudem translozierte ein Teil des zytoplasmatischen Nek1 in den Kern und colokalisierte dort gemeinsam mit γH2AX und NFB1/MDC1 in distinkten Foci. Da beide Proteine wichtige und frühe Marker für DNA-Doppelstrangbrüche sind, besteht die Vermutung, dass auch Nek1 eine Funktion in der Schadenserkenkung von strahlungsinduzierten Doppelstrangbrüchen hat. Diese Vermutung wird durch die Tatsache bestätigt, dass Nek1-defiziente Fibroblasten eine deutlich erhöhte Sensitivität gegenüber, durch ionisierende Strahlung induzierten, DNA-Schäden zeigen [84].

Chen et al. konnten zeigen, dass Nek1 zudem eine wichtige Rolle bei der Checkpoint-Aktivierung spielt. Sie stellten fest, dass Nek1-defiziente Zellen nach einem DNA-Schaden nicht mehr am G1/S- oder am M-Checkpoint arretieren. Da die Integrität dieser Checkpoints in direktem Zusammenhang mit einer funktionalen Aktivierung der Kinasen Chk1 und Chk2 steht, stellten Chen et al. die Vermutung auf, dass Nek1 eine Rolle bei der Aktivierung einer oder beider Kinasen inne hat. Daher ist Nek1 nicht zwangsläufig essentiell für den Eintritt in, und/oder die Progression durch, die Mitose, hat aber eine scheinbar wichtige Funktion bei der Regulation der Chromosomensegregation [85]. Einen weiteren Hinweis hierauf liefern auch die Arbeiten von Lanza et al.. Sie konnten zeigen, dass Nek1 gemeinsam mit CLASP2 (*cytoplasmic linker associated protein 2*) und FEZ1 (*fasciculation and elongation protein zeta-1*) colokalisiert, welche wiederum mit endogenem γ-Tubulin interagieren und so gemeinsam bei der Regulation der Zentrosomenfunktion eine Rolle spielen [86]. Es zeigte sich, dass Nek1-defiziente Zellen Fehler bei der Aufteilung der Chromosomen in die Tochterzellen haben, und es so vermehrt zu Aneuploidien kommt. Ein Fortschreiten dieser Zellen im Zellzyklus resultierte anschließend zudem in unkontrollierter Proliferation und gleichzeitiger Blockade der intrinsischen Apoptose nach einer Schädigung der DNA [87, 88].

Der Zusammenhang zwischen der Funktion von Nek1 und der Reparatur durch genotoxische Chemikalien ausgelöster Schäden wurde von Pellegrini et al. untersucht. So zeigte sich, dass die Funktion von Nek1, auch bei dem deutlich im Vergleich zum röntgeninduzierten komplexeren Schadensmuster, wie es durch derartige Substanzen ausgelöst wird, vergleichbar

mit den Vorgängen bei ionisierender Strahlung ist. Sie stellten fest, dass Nek1 für die Auslösung des G2/M-Arrestes geschädigter Zellen verantwortlich ist und eine wichtige Rolle bei der Prävention des durch DNA-Schäden ausgelösten Zelltodes spielt [77].

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Nek1 scheinbar essentiell für die Funktionalität von Chk1, jedoch nicht für die Phosphorylierung von H2AX ist, was Pellegrini et al. zu der Vermutung veranlasst, dass Nek1 *downstream* von ATM, jedoch *upstream* von Chk1 in der DNA-Reparatur Signalkaskade agiert. Kürzlich konnten allerdings Chen et al. zeigen, dass Nek1 unabhängig von den *PI3-kinase like* Proteinen ATM und ATR, arbeitet. So konnten weder ATM- und ATR-Inhibitoren die Nek1-Funktionalität beeinflussen, noch zeigte sich eine veränderte Aktivität von ATM und ATR in Nek1^{-/-} Mausmutanten [88]. Eine Funktion von Nek1 bei der Phosphorylierung von H2AX ist jedoch laut Pellegrini et al. nicht ganz auszuschließen [77].

Als weitere regulatorische Funktion von Nek1 wurde die Phosphorylierung von VDAC1 (*voltage dependent anion channel 1*) an Serin 193 beschrieben [89]. Der VDAC1-Kanal stellt eines der Schlüsselemente bei der mitochondrialen Permeabilität dar. Diese ist kritisch für die Initiation der Apoptose. Erhöht sich die Permeabilität der mitochondrialen Membran, so können apoptoseinduzierende Faktoren wie Cytochrom C oder auch AIF (*apoptosis inducing factor*) ins Zytoplasma gelangen und die Apoptosesignalkaskaden aktivieren [90, 91].

Die Phosphorylierung von VDAC1 durch Nek1 scheint direkt auf die Öffnung bzw. Schließung dieses Kanals einzuwirken und damit auch direkt die Permeabilität der Mitochondrien zu beeinflussen. In Nek1-defizienten Zellen zeigt sich, dass diese deutlich erhöht ist. Damit einhergehend zeigt sich auch eine erhöhte Letalität der Zellen [89]. Nek1 nimmt somit scheinbar einen direkten Einfluss auf die mitochondrienabhängige Signalkaskade des Zelltodes [89, 92].

1.8 MAPKinase Pathway

MAPKinasen (*mitogen activated protein kinases*) sind evolutionär hoch konservierte Enzyme, die Zelloberflächenrezeptoren mit kritischen regulatorischen Molekülen in der Zelle verbinden [93]. Die MAP-Kinasen wirken an einer Vielzahl biologischer Prozesse mit. Ihre grundlegende Kinaseaktivität bewirkt die Aktivierung diverser Transkriptionsfaktoren und Signalproteine die ihrerseits, nach Aktivierung, in die Signalkaskaden eingreifen. Einige der regulatorischen Prozesse, an denen MAP-Kinasen beteiligt sind, sind die Remodulierung des Chromatins, die Steigerung der Proteinbiosynthese, unter anderem durch die Phosphorylierung ribosomaler Proteine, die Regulation des Zellzykluses und nicht zuletzt auch die Hemmung der Apoptose [94]. Die mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAP und/oder ERK (*extracellular-signal regulated kinase*)) beeinflussen nicht nur die Mitose, sondern wirken zudem auch bei der Meiose, unter anderem durch Unterdrückung der DNA-Replikation während der meiotischen Teilungen, mit [95].

Die Aktivierung der MAP-Kinase erfolgt in der Regel über Mitogene, kann jedoch auch durch exogenen und endogenen Stress wie ROS oder Bestrahlung ausgelöst werden. Auch Signalproteine wie das Tumorsuppressorprotein p53 können die Signalkaskade aktivieren [Lee, 2000]. Wird die Signalkaskade angeschaltet, so wird Raf (*rapidly accelerated fibrosarcoma*) aktiviert, wodurch über die Aktivierung von MEK 1/2 (*MAPK kinase*) die Phosphorylierung von Erk 1/2 induziert wird. Diese Kaskade, welche häufig auch Erk1/Erk2-Signalkaskade genannt wird, wirkt sich auf das Wachstum und die Proliferation von Zellen, sowie deren Differenzierung stimulierend aus. Gerade die Aktivierung von Erk1/2 ist notwendig für das Fortschreiten der Zellen von G1 zur S-Phase im Zellzyklus. Damit assoziiert ist auch die Induktion positiver Regulationsmechanismen des Zellzykluses, und die Inaktivierung der Expression antiproliferativer Gene [96].

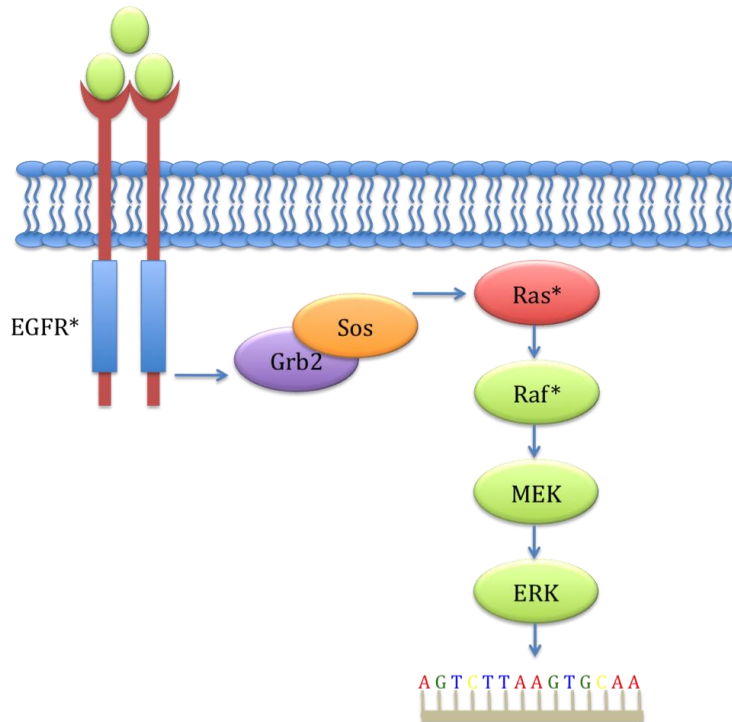


Abbildung 6: MAPKinase-Pathway. Wachstumsfaktoren binden am EGFR (*epidermal growth factor receptor*) und starten damit die Signalkaskade. Über den Grb2/Sos-Komplex (*growth factor receptor-bound protein 2 /son of sevenless*) wird Ras aktiviert und die Phosphorylierungskaskade gestartet. Ras phosphoryliert das nachfolgende Raf, welches wiederum die MEK (*mitogen-activated protein kinase kinase*) aktiviert. Diese phosphorylieren Erk1/2 (*extracellular-signal-regulated kinases*) welche daraufhin auf die Transkription und damit auf eine Vielzahl endogener Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Zellwachstum einwirken können.

Bei über 30% aller Krebsarten zeigte sich, dass dieser Signalweg hyperaktiviert vorliegt [97]. Aber auch bei anderen Erkrankungen spielt die MAPKinase Aktivität eine Rolle. So zeigte sich unter anderem eine vermehrte Akkumulation von phosphoryliertem Erk1/2 in den Mitochondrien von Parkinson Patienten [98, 99].

Gerade die Vielzahl der Prozesse auf die MAPKinasen direkt oder indirekt einwirken, sowie die Möglichkeit, den dazugehörigen Signalweg durch Stress zu induzieren, macht sie zu einem potentiellen Target für Untersuchungen von Strahlungseinflüssen.

1.9 Poly-ADP-Ribosylierung, PARP und PARG

Die Poly-ADP-Ribosylierung ist eine posttranslationale Modifikation von Proteinen. Sie und die daran beteiligten Moleküle und Proteine Poly-ADP-Ribose (PAR), Poly-ADP-Ribosepolymerase (PARP) und Poly-ADP-Riboseglycohydrolase (PARG) werden im Zusammenhang mit einigen essentiellen Mechanismen für das Überleben der Zelle beschrieben. Neben der DNA-Reparatur und Mitose [100], sind dies die Modulation der Chromatinstruktur [101], die Regulation intrazellulärer Transportvorgänge, Transkription [102-105] sowie die Telomerregulation bis hin zum Zelltod [106].

Während PARPs als Polymerasen die Bildung von Poly-ADP-Ribose katalysieren, antagonisiert PARG diesen Prozess durch die Hydrolyse glycosidischer Bindungen der ADP-Ribose-Polymere und generiert damit wieder monomere ADP-Riboseeinheiten [107].

Die Poly-ADP-Ribosepolymerasen nutzen für die Synthese von PAR NAD^+ als Substrat und generieren daraus schrittweise ein verzweigtes Homopolymer aus ADP-Ribose-Einheiten (siehe Abbildung 7) [108, 109]. Interessanterweise findet diese posttranslationale Proteinmodifikation der kovalenten Poly-ADP-Ribosylierung zum größten Teil an den PAR-Polymerasen im Zuge der Automodifikation selbst statt [110].

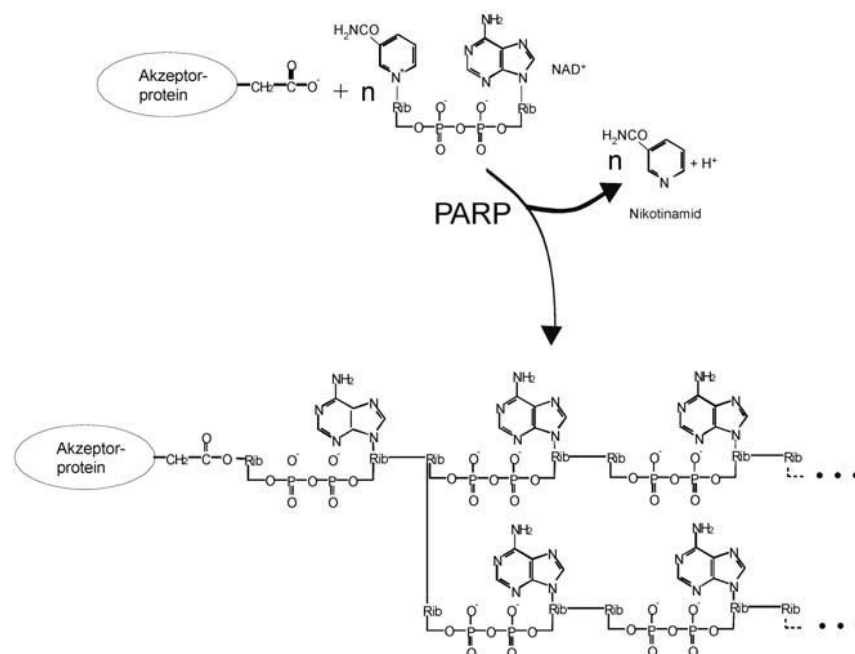


Abbildung 7: APD-Ribose-Aufbau (Quelle: [110])

Bereits 1983 wurde von Slattery et al. die essentielle Rolle von PARP-1 für die Regulation der Transkriptionsinitiation beschrieben [102]. In späteren Arbeiten von Oei et al. wie auch von Hassa und Hottinger wurde auch die Interaktion und Poly-ADP-Ribosylierung mit anderen Transkriptionsfaktoren nachgewiesen [104, 105].

Im Zusammenhang mit der DNA Schadensantwort und -reparatur spielt gerade die Entfernung von PAR von modifizierten Proteinen, einschließlich PARP-1, durch PARG eine prominente Rolle [111]. In der Reparatur von Einzelstrangbrüchen (SSBR, *single strand break repair*) wurde PARG, in Kooperation mit PARP-1, als eine der kritischen Komponenten identifiziert. So konnte gezeigt werden, dass die schnelle Synthese von Poly-ADP-Ribose (PAR) durch PARP an den zu modifizierenden Molekülen, gefolgt vom schnellen Abbau durch PARG eines der frühesten Ereignisse bei der SSB Reparatur ist [112].

Auch *sh-RNA*-Experimente von Ame et al. spiegelten die wichtige Funktion in der DNA Schadensantwort und -reparatur von Doppel- und Einzelstrangbrüchen wieder. Die *shRNA* basierte Herunterregulation von PARG und damit die einhergehende Akkumulation von PAR wirkte sich interessanterweise in ungeschädigten Zellen nicht nachteilig aus. So zeigte sich vielmehr eine geringere Rate an spontanen Einzelstrangbrüchen und Telomermodifikationen. Nach Induktion eines Schadens durch ionisierende Strahlung zeigten die PARG-defizienten Zellen jedoch eine deutlich erhöhte Radiosensitivität, ausgelöst durch Defekte in der SSB- und DSB-Reparatur. Außerdem traten Störungen des mitotischen Spindelcheckpoints auf, die zu einer Veränderung der Progression der Mitosen führten. Es entstanden vermehrt Zentrosomenamplifikationen und multiple Spindelpole, welche im Fortschreiten des Zellzykluses in aberranten mitotischen Strukturen endeten und schlussendlich polyploide Zellen hervorbrachten, oder in den potentiellen Zelltod durch mitotische Katastrophen führten [30].

Masutani et al. stellten ebenfalls eine erhöhte Sensitivität gegenüber den letalen Effekten ionisierender Strahlung, aber auch alkylierender Substanzen, sowohl in PARG-, als auch in PARP-1-defizienten Zellen fest [113].

Auch in diversen *in vivo loss-of-function* Experimenten spiegelt sich die kritische Rolle von PARG in der DNA-Reparatur wieder. Murine Embryonen mit PARG^{-/-} Mutationen [114], wie auch *Drosophila* PARG-Mutanten [115] zeigen neben einer erhöhten Letalität der Zellen zudem eine deutlich erhöhte Sensitivität gegenüber gentoxischen Substanzen [114].

1.10 *Heat Shock Proteine*

Die ersten *Heat Shock* Proteine (HSP) wurden in *Drosophila melanogaster* in den 60iger Jahren des vorigen Jahrhunderts von Ritossa et al. entdeckt [116]. Mittlerweile wurden *Heat Shock* Proteine in einer Vielzahl von Organismen hochkonserviert nachgewiesen. Die Einteilung und Benennung der Mammalier HSPs erfolgte entsprechend ihrem Molekulargewicht in kDa [117]. Die fünf Hauptfamilien sind die HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 und die *small HSPs* von 15-30 kDa [118, 119].

Zunächst stellte man fest, dass Zellen, dank der Expression von Heat Shock Proteinen, eine deutlich höhere Temperaturleranz zeigten, wenn sie vor Behandlung einer kurzen Temperaturerhöhung ausgesetzt waren. Später zeigte sich, dass HSP zudem als molekulare Chaperone fungieren, die die Proteinfaltung koordinieren und auch Funktionen beim Proteintransport übernehmen. HSPs mit hohem Molekulargewicht sind ATP-abhängige Chaperone, wogegen die kleinen HSPs für ihre Funktionalität kein ATP benötigen [118, 120]. Die Chaperonfunktion der HSPs bei der Koordination der Proteinfaltung, der Stabilisierung der Konformation wie auch der Prävention unerwünschter Aggregationen der zu schützenden Proteine, ist vermutlich der Grund dafür, dass HSPs stetig ubiquitär in der Zelle vorliegen. Vermehrt exprimiert werden *Heat Shock* Proteine vor allem bei zellulärem Stress durch Hitze, Toxine, Inflammation oder auch strahleninduziertem Stress [121].

HSPs übernehmen zudem auch Funktionen im Immunsystem, über die Präsentation von Antigenen auf der Zelloberfläche. Gerade diese Fähigkeit macht sie auch für die Pharmaforschung interessant. So konnte bereits gezeigt werden, dass HSPs als Adjuvanz zur Funktionalitätssteigerung von Vaccinen, unter anderem auch für die Krebstherapie, eingesetzt werden können [73, 122].

Die Transkription von HSP-Genen wird von der Familie der *Heat Shock* Transkriptionsfaktoren (HSF) reguliert. Zu diesen gehört auch HSF1, welches vor allem für die kurzzeitigen HSP-Expressionen verantwortlich ist [118, 123, 124]. Kürzlich wurde gezeigt, dass HSF1 bei der, über Ras-Aktivierung oder p53-Inaktivierung, vermittelten Tumorentwicklung eine Rolle spielt [118, 125, 126].

Aber auch die *Heat Shock* Proteine selbst wurden mehrfach im Zusammenhang mit der Krebsentstehung beschrieben. Gerade ihre Schutzfunktion vor der Induktion der Apoptose bei zellulärem Stress ist es, die im Umkehrschluss auch Tumorzellen resistenter gegenüber apoptoseinduzierenden Behandlungen werden lässt. Eine erhöhte Expression von HSP27 in

Tumorzellen zeigt sich gerade in aggressiven Tumoren, die eine erhöhte Resistenz in der Chemotherapie zeigen [118, 127]. HSP70, welches ebenfalls eine antiapoptotische Wirkung und zudem eine Inhibition der Seneszenz zeigt, findet sich in ebenfalls in einem großen Spektrum an Tumoren. Ein hohes HSP70-Expressionslevel wird zudem als Anzeichen für eine schlechte Tumorprognose gesehen [118, 128]. HSP90 ist besonders in malignen Zellen vertreten und zeigt seine tumorfördernde Wirkung durch Stabilisierung von onkogenen Proteinen, sowie ebenfalls durch seine antiapoptotische Schutzwirkung [118, 129]. Zudem wirkt es sich positiv auf die Angiogenese aus [118].

1.11 Zielsetzung

In der Literatur wird die Wirkung naher Infrarotstrahlung (NIR) nahezu durchgängig als positiv beschrieben. So zeigten sowohl Menezes et al., als auch Frank et al. eine zytoprotektive Wirkung von NIR gegenüber UV induzierter Zytotoxizität und Apoptose [7, 11]. Weitere Gruppen konnten ebenfalls schützende Wirkung zum Beispiel gegen die Wirkung chemischer Agentien in neuronalen Zellen zeigen. Die Gruppen um Wong-Riley und Eells zeigten sogar eine protektive Wirkung für die Retina und neuronale Zellen nach Schädigung des Gewebes durch mitochondriale Gifte [6, 130, 131]. Die genannten Arbeiten stellen dabei nur einen kleinen Auszug der beschriebenen Effekte naher Infrarotstrahlung dar.

Es lag also die Vermutung nahe, dass nahe Infrarotstrahlung ebenfalls eine protektive Wirkung gegen zelluläre Schäden hat, welche durch ionisierende Strahlungen, wie zum Beispiel Röntgen, induziert werden.

Ziel dieser Arbeit war daher die Untersuchung des Einflusses einer Vorbehandlung von Zellen mit naher Infrarotstrahlung, auf die Schadensantwort der Zellen nach Röntgenbestrahlung. Auf zellulärer und molekularer Ebene sollten dabei der Einfluss auf

- die Proliferation,
- die genomische Stabilität,
- die DNA Reparatur,
- die Induktion reaktiver Sauerstoffspezies,
- die Integrität der Mitochondrien,
- die Aktivierung potentiell relevanter Signalkaskaden,
- sowie die Expression von potentiell relevanten Genen

untersucht werden.

Da sowohl nahes Infrarotlicht, als auch Röntgen, Strahlenqualitäten darstellen, die auch für medizinische Zwecke eingesetzt werden, sollten Dosen verwendet werden, die einen Anwendungsbezug haben. Es wurden für die Untersuchungen daher in Anlehnung an Menezes und Frank et al. [7, 11] Infrarotdosen aus einem Bereich gewählt, für den bereits eine strahlenprotektive Wirkung gezeigt werden konnte und die zudem auch über die Exposition der natürlichen, solaren Strahlung erreicht werden können.

Ionisierende Strahlung wird in höheren und damit potentiell schädigenden Dosen in der Tumorthherapie eingesetzt. Da eine potentiell protektive Wirkung von NIR in Hinblick auf die

schädigende Wirkung der Röntgenstrahlung damit eine Therapierelevanz hätte, sollten auch hier Dosen verwendet werden, die soweit als möglich den therapeutischen entsprechen [132].

Aus dem geforderten Anwendungsbezug ergab sich zudem, dass vor allem Zelltypen untersucht werden sollten, die beiden Strahlenqualitäten ausgesetzt sein könnten. Da der limitierende Faktor dabei die NIR Exposition ist, wurden Zelltypen gewählt, die nachweislich natürlicherweise nahem Infrarotlicht ausgesetzt sind. Es sollten daher dermale und retinale Zelltypen untersucht werden, da NIR auf beide Gewebe einwirken kann [133, 134].

Als Vertreter für dermale Zellen sollten murine Fibroblasten (NIH/3T3) und humane Keratinozyten (HaCaT) eingesetzt werden. Stellvertretend für retinales Gewebe sollten R28 retinale Vorläuferzellen aus der Ratte eingesetzt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Allgemeines Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Analysewaage 1202 MP	Sartorius, Göttingen
Analysewaage LC 620 S	Sartorius, Göttingen
Autoklav	Thermo Scientific, Dreieich
Bio-Rad MiniProtean Tetracell mit WetBloteinsatz	Bio-Rad, München
CO ₂ -Inkubator Hera Cell 240	Thermo Scientific, Langenselbold
Digital-pH-Meter	Knick, Egelsbach
Gefahrstoffabzug 2-453-DAGD	Köttermann, Uetze-Hänigsen
Gelkammer 40 mL, 60 mL	Peqlab, Erlangen
Heizblock	Bioblock scientific, Dubuque, USA
Kühlschrank Liebherr Profiline, 4°C	Liebherr, Ochsenhausen
Laborzentrifuge Z 233 MK-2	Hermle Labortechnik, Wehingen
Laminar Flow-Werkbank Hera Guard	Thermo Scientific, Dreieich
Magnetrührer IKA-COMBIMAG RCT	Janke & Kunkel, Staufen
Mikroskop Axiophot Fluoreszenz	Zeiss, Göttingen
Mikroskop Axio Observer	Zeiss, Göttingen
Mikroskop Axiovert S100	Zeiss, Göttingen
Röntgenröhre	Philips MCN 165/796704
Spannungsgerät Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Thermocycler Mastercycler gradient 5331	Eppendorf, Hamburg
Tiefkühlschrank Hera Freeze, -80°C, -20°C	Thermo Scientific, Langenselbold
Tischzentrifuge	NeoLab, Heidelberg
Trockenschrank	Memmert, Büchenbach
Vortex Reax2000	Heidolph, Schwabach

Wasserbad	Köttermann, Uetze-Hänigsen
Zentrifuge 3K10, Rotor 11133	Sigma-Aldrich, Steinheim
Zentrifuge Heraeus Biofuge Primo R, Rotor 7588	Thermo, Osterode
T75 Zellkulturflaschen	Greiner, Frickhausen
Zentrifugenröhrchen 15 mL, 50 mL	Sarstedt, Nümbrecht

2.1.2 Sonstige Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
100 bp DNA-Ladder, extended	Fermentas, St. Leon-Rot
12-Well Zellkulturplatten	Greiner, Frickhausen
24-Well Zellkulturplatten	Greiner, Frickhausen
3,5 cm Kulturschalen	Sarstedt, Nümbrecht
6 cm Zellkulturschalen	Greiner, Frickhausen
Deckgläser 24 x 60 mm	Roth, Karlsruhe
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Bioline, Luckenwalde
Glas Cover Slips Ø 10, 12, 15 mm	VWR, Darmstadt
Membran für Explantate (Cellulose-Mischester)	Whatman® Membranfilter
Pipettenspitzen 10 µL, 100 µL, 1.000 µL	Greiner, Frickhausen
Reaktionsgefäße 0,2 mL	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 1,5 mL, 2 mL	Greiner, Frickhausen
T25 Zellkulturflaschen	Greiner, Frickhausen

2.1.3 Chemikalien

Chemikalien	Bezugsquelle
10x Polymerase-Puffer	Qiagen, Hilden
4,6-Diamidino-2'-phenylindoldihydrochlorid (DAPI)	Roche, Mannheim
Agarose	Peqlab, Erlangen
APS	Merck, Darmstadt
Bis-Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Brom-Desoxyuridintriphosphat (BrdU)	Sigma-Aldrich, Steinheim

BSA	Sigma, Deisenhofen
2',7'-Dichlorofluorescein diacetat (DCFDA)	Sigma, Deisenhofen
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth, Karlsruhe
dNTP-Mix	Fermentas, St. Leon-Rot
EDTA	Merck, Darmstadt
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Merck, Darmstadt
HCl	Merck, Darmstadt
HEPES	Sigma, Deisenhofen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaiser's Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
KCl	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
MitoTracker Green	Molecular Probes, USA
MgCl ₂	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
Natrium Acetat	Merck, Darmstadt
Natrium Citrat	Merck, Darmstadt
NBT/BCIP	Roche, Mannheim
Saccharose	Roth, Karlsruhe
SDS	Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
SYTOX Orange	Invitrogen, Darmstadt
TEMED	Roth, Karlsruhe
Triethoxysilyl-propylamin (TESAP)	Roth, Karlsruhe
Tris-Base	Merck, Darmstadt
Triton X 100	Merck, Darmstadt
Trypsin/EDTA 0,05%	Gibco, Eggenstein

2.2 Material Zellkultur

2.2.1 Medien, Zusätze und Lösungen für die Zellkultur

Medien	Hersteller
DMEM (high glucose)	Gibco, Eggenstein
F12	Gibco, Eggenstein
HBSS	Sigma-Aldrich, Steinheim
MEM	PAA, Cölbe

Zusätze	Hersteller
Fötales Kälber Serum (FCS)	Biochrom, Berlin perbio, Thermo Fisher Scientific, Bonn
L-Glutamin (200 mM)	Gibco, Eggenstein
Penicillin/Streptomycin (1000 U/mL; 1000 µg/mL)	Gibco, Eggenstein
Gentamycin	Serva, Heidelberg
NEAA (100x)	Gibco, Eggenstein
Sodium Pyruvat (100x)	Gibco, Eggenstein
Insulin	Sigma, Deisenhofen

Medium	Zusammensetzung
Maus-Primärkulturmedium	DMEM, 10% FCS (v/v), 2mM L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin (v/v),
NIH/3T3-Kulturmedium	DMEM, 10% FCS (v/v), 2mM L-Glutamin, 1% NEAA (v/v), 1% Penicillin/Streptomycin (v/v)
R28-Kulturmedium	DMEM, 10% FCS (v/v), 2mM L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin (v/v)
HaCaT-Kulturmedium	DMEM, 10% FCS (v/v), 2mM L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin (v/v)

Medium	Zusammensetzung
Bestrahlungsmedium für NIR-Bestrahlung	DMEM (carbonatfrei), 10mM HEPES, pH 7,2
Lösung	Zusammensetzung
4%iges Paraformaldehyd	16 g Paraformaldehyd (PFA), ad 400 mL 1x PBS, Lösen durch pH 11 mit 10 M NaOH, mit 1 M HCl auf pH 7,3 einstellen
4%iges Formalin	280 mL Formalin (37%ig, säurefrei), 9,07 g KH ₂ PO ₄ , 11,82 g Na ₂ HPO ₄ , ad 1000 mL dH ₂ O, mit 1M HCl auf pH 7,3 einstellen
10x PBS	100 g NaCl, 2 g KCl, 11,5 g Na ₂ HPO ₄ , 2 g KH ₂ PO ₄ , ad 100 mL dH ₂ O, mit 1 M NaOH auf pH 7,3 einstellen
1x PBS	50 mL 10x PBS, ad 500 mL dH ₂ O
EDTA/PBS	
Trypsin/EDTA	0,5g/L Trypsin, 0,2g/L EDTA*4Na in Hanks Balanced Salt Solution (HBSS), ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺ , Phenolrot (Gibco, Darmstadt)
2.2.2 Zelllinien	

Bezeichnung	Bezugsquelle
NIH/3T3 murine embryonale Fibroblasten	DSMZ, Braunschweig
HaCaT humane Keratinozyten	Dermatologisches Zentrum, Buxtehude
R28 retinal precursor	Gail. M Seigel

2.3 Material Immunhistochemie

2.3.1 Lösungen für Histochemie

Puffer	Zusammensetzung
Blocklösung	5 % BSA (w/v), 0,1 % Triton (v/v) in 1xPBS
Weise-Puffer	0,63 g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O, 0,31 g KH ₂ PO ₄ , ad 1 L mit dH ₂ O, pH7,2
Giemsa-Färbelösung	5% Giemsa (Merck) in Weise-Puffer

2.3.2 Primäre Antikörper

Epitop	Hersteller	verwendete Verdünnung	Spezies
α -BrdU (G3G4)	DSHB (Kaufmann, S.J.)	1:500 (IHC)	m
α -Bcl2	Santa Cruz	1:1.000 (WB)	m
HRP- α -GAPDH	Sigma	1:15.000 (WB)	rb
α -MAPK1/2	Sigma	1:1.000 (WB)	m
α -p53	Santa Cruz	1:200 (WB)	m
α -phospho-p53	Cell Signaling	1:1.000 (WB)	m
α - γ H2AX	Millipore	1:500 (IHC), 1:1.000 (WB)	m
α -Nek1	Abgene	1:1.000 (WB)	rb
MAPK (pErk1/2)	Sigma	1:1.000 (WB)	m

2.3.3 Sekundäre Antikörper

Fluorophor/Chromophor - Host α epitop	Hersteller	Verdünnung	Host
Cy3-d α m	Dianova	1:200	d
Cy3-rb α m	Dianova	1:200	rb
Cy2-d α m	Dianova	1:200	d
Cy2-g α rb	Dianova	1:200	rb
HRP-rb α m	Dianova	1:15.000	rb
HRP-g α rb	Dianova	1:15.000	g

2.3.4 FACS Reagenzien für AnnexinV Detektion

Puffer	Zusammensetzung
10 x Annexin Binding Buffer	100 mM HEPES 1,4 M NaCl 25 mM CaCl ₂ 1%BSA pH auf 7,4 einstellen
1x Annexin Binding Buffer	1 mL 10x Annexin Binding Buffer ad 100 mL mit MilliQ H ₂ O

Epitop	Hersteller	verwendete Verdünnung
AnnexinV-FITC konjugated Reagent	Promokine	1:1.000

2.4 Material Molekularbiologie

2.4.1 Enzyme, sonstige Proteine, verwendete Kits

Enzyme, Proteine, Kits	Hersteller
Masterpure Complete DNA- and RNA-Isolation Kit	Epicenter (Biozym), Hessisch Oldendorf
Reverse Transkriptase (RevertAid™ First Strand cDNA-Synthesis Kit)	Fermentas, St. Leon-Roth
Ribolock RNase-Inhibitor	Fermentas, St. Leon-Rot
TopTaq® Taq-Polymerase-PCR Kit	Qiagen, Hilden
Primer	Sigma, Deisenhofen

2.4.2 Primer

Spezies	Gen	Richtung	Primer	Primer-Sequenz	Annealing	Produkt	Location	Zielsequenz	BLAST-Sequenz
mus musculus	GAPDH	forward	GAPDH mouse fwd	TGTGAGGGAGATGCTCAGTG	56°C	396 bp	1141-1122	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh)	NM_008084.2
		reverse	GAPDH mouse rev	TGTTCTACCCCCAATGTGT			765-746		
	Hsp70 (Hspa1b)	forward	Hspa1b_m_ff (310bp)	GCTGCTTGGGCACCGATTACTGT	55°C	310 bp	2217-2239	Heat shock protein 1B (Hspa1b) = HSP70	NM_010478.2
		reverse	Hspa1b_m_rev (310bp)	CTCCAGGGAAGTGGGCAGCTAGA			2526-2504		
	Hsp27	forward	hsp27(m)ff_147bp	GCCGCACCAAGCCTTCAGC	54°C	147 bp	357-374	Heat shock protein 1 (Hspb1)	NM_013560
		reverse	hsp27(m)rev_147bp	CACGCCTTCCTTGGTCTTCACT			482-503		
	PARG	forward	PARG mouse fwd 265bp	GAGCCGGAGCCCGATCTCGA	56°C	265 bp	16-35	Mus musculus poly (ADP-ribose) glycohydrolase (Parg)	NM_011960.2
		reverse	PARG mouse rev 265bp	CTCATGCTGGGACCCGACGC			261-280		
rattus norvegicus	PARP-1	forward	PARP-1 mouse fwd 258bp	GAGTACGCGAAGAGCGGGCG	56°C	258 bp	93-112	Mus musculus poly (ADP-ribose) polymerase family, member 1 (Parp1)	NM_007415.2
		reverse	PARP-1 mouse rev 258bp	TTTGCCTGCCACGCCTCCAG			331-350		
	Nek1	forward	Nek1 mRNA mouse fwd	GCGGCAAGAGAAGCAGCGGT	56°C	362 bp	1745-1764	NIMA (never in mitosis gene a)-related expressed kinase 1 (Nek1)	NM_175089.3
		reverse	Nek1 mRNA mouse fwd	CCACGTGTCCTTCGGCTCGG			2087-2106		
	p53	forward	p53-ff-m	GCCACTCCATGGCCCCTGT	56°C	744 bp	375-393	Transformation related protein 53 (Trp53), transcript variant 1	NM_011640.3
		reverse	p53-rv-m	ACGCCCGCGGATCTTGAGG			1100-1118		
	GAPDH	forward	GAPDH-ff-rat	TGACCTCAACTACATGGTCTACATG	52°C	938 bp	184-208	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh)	NM_017008.3
		reverse	GAPDH-rv-rat	CTTGCTCTCAGTATCCTTGCTGG			1099-1121		
rattus norvegicus	Nek1	forward	Nek1 rat fwd 172bp	AGAAGGGCCCTCGGATTGCG	56°C	172 bp	3199-3218	NIMA (never in mitosis gene a)-related expressed kinase 1 (Nek1)	NM_001106082.2
		reverse	Nek1 rat rev 172bp	TGTCCCTCTTGCTGCCCGCT			3370-3351		
	p53	forward	p53-ff-rat	CTGCCACACAGCGACAGG	56°C	799 bp	225-244	Tumor protein p53 (Tp53)	NM_030989.3
		reverse	p53-rv-rat	GCAGCTCCGGGCAATGCTCT			643-662		

Alle Primer wurden mittels Primer Design Tool der NCBI aus den jeweils angegebenen mRNA BLAST-Sequenzen selbst abgeleitet und anschließend von Sigma, Deisenhofen bezogen.

2.5 Material Proteinchemie

Puffer, Lösungen	Zusammensetzung
10x TBS-Puffer	160 g NaCl, 48,4 g Tris, MilliQ-H ₂ O ad 2 L, pH 7,6
1x TBST-Puffer	100 mL 1x TBS, 0,1% Tween20, MilliQ-H ₂ O ad 1 L
5x Laufpuffer für SDS-Gelelektrophorese	0,25 M Tris, 1,92 M Glycin in MilliQ-H ₂ O
1x Laufpuffer für SDS-Gelelektrophorese	200 mL 5x Laufpuffer, 10 mL 10% SDS, MilliQ-H ₂ O ad 1 L
5x Lämmli-Auftragspuffer	300 mM TrisHCl (pH 6,8), 10% SDS, 25% β -Mercaptoethanol, 50% Glycerin, 0,02% Bromphenolblau
Blotting-Puffer	200 mL 5x Laufpuffer, 200 mL MeOH, MilliQ-H ₂ O ad 1 L
Membranstripping-Puffer	5 mL 1 M Glycin (pH 2,8), MilliQ-H ₂ O ad 50 mL
Ponceau S-Färbelösung	0,1% Ponceau S in 5% Essigsäure
Proteinauflösungs-Puffer	20 mM Tris-HCl (pH 8,5), 1 mM EDTA, 1 mM β -Mercaptoethanol, 5 % Glycerin, 0,5 mM PMSF, 10 mM DTT, 1 μ M Na ₃ VO ₄ in MilliQ-H ₂ O
SDS-Sammelgel-Puffer	1,0 M Tris-HCl, pH 6,8
SDS-Trenngel-Puffer	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8



SDS-Gel	Zusammensetzung
SDS-Trenngel (10 mL)	3,4 mL MilliQ-H ₂ O, 4,0 mL 30% Acrylamide/Bis, 2,5 mL Trenngel-Puffer, 0,1 mL 10% SDS, 50 µL 10% APS, 5 µL TEMED
SDS-Sammelgel (5 mL)	4,15 mL MilliQ-H ₂ O, 1,0 mL 30% Acrylamide/Bis, 0,76 mL Sammelgel-Puffer, 60 µL 10% SDS, 60 µL 10% APS, 6 µL TEMED
Fertiglösungen, Membranen	Hersteller
Bradford-Lösung Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate	BioRad, München
RapidStep™ ECL Reagent	Calbiochem, Merck, Darmstadt
Nitrocellulosemembran	Roth, Karlsruhe
Lumi Light	Roche, Mannheim

2.6 Zellkulturen

2.6.1 Kultivierung, Passage von NIH/3T3 Fibroblasten (murine embryonale Fibroblasten)

Kulturmedium: DMEM (high Glucose, 4,5 g/L), 15%FBS, 4mM L-Glutamin, 1% NEAA, 0,5% Pen/Strep

Kryomedium: DMEM (high Glucose, 4,5 g/L), 40%FBS, 10%DMSO, 4mM L-Glutamin, 1% NEAA, 0,5% Pen/Strep

Das Kulturmedium wird entfernt und die Zellen einmal mit PBS⁺⁺ gewaschen. Es wird 1 mL Trypsin-EDTA zugefügt und für ca. 1-2 min inkubiert. Die Reaktion wird mit 5 mL Kulturmedium gestoppt. Die Zellen werden durch mehrmaliges Pipettieren vereinzelt, die Zellzahl bestimmt und die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Es erfolgt eine Zentrifugation bei 180 g, 10 min. Der Überstand wird entfernt und frisches Kulturmedium zugefügt. Es werden ca. 300.000 Zellen in eine neue Kulturflasche überführt und 5 mL frisches Kulturmedium zugegeben. Alle Volumina sind bezogen auf 25 cm² Zellkulturgefäßfläche.

Die Inkubation der Zellen erfolgt bei 37°C, 5,0% CO₂ im Brutschrank. Passagen erfolgten in der Regel bei 80-90% Konfluenz.

2.6.2 Kultivierung und Passage von R28 retinale precursor (rattus norvegicus)

Kulturmedium: DMEM (high Glucose, 4,5 g/L), 10%FBS, 2mM L-Glutamin, 0,1% Pen/Strep (ggf. 1%)

Kryomedium: DMEM (high Glucose, 4,5 g/L), 40%FBS, 10%DMSO, 2mM L-Glutamin, 0,1% Pen/Strep

Das Kulturmedium wird entfernt und die Zellen einmal mit EDTA/PBS⁻⁻ gewaschen. Es wird 1 mL Trypsin-EDTA zugefügt und für ca. 1-2 min inkubiert. Die Reaktion wird mit 5 mL Kulturmedium gestoppt. Die Zellen werden durch mehrmaliges Pipettieren vereinzelt, die Zellzahl bestimmt und die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Es erfolgt eine Zentrifugation bei 180 g, 10 min. Der Überstand wird entfernt und frisches Kulturmedium zugefügt. Es werden ca. 300.000 Zellen in eine neue Kulturflasche überführt und 5 mL frisches Kulturmedium zugegeben. Alle Volumina sind bezogen auf 25 cm² Zellkulturgefäßfläche.

Die Inkubation der Zellen erfolgt bei 37°C, 5,0% CO₂ im Brutschrank. Passagen erfolgten in der Regel bei 80-90% Konfluenz.

2.6.3 Kultivierung und Passage von HaCaT (humane epidermale Keratinozyten)

<i>Kulturmedium:</i>	DMEM (high Glucose, 4,5 g/L), 10%FBS, 2mM L-Glutamin, 1% Pen/Strep
<i>Kryomedium:</i>	DMEM (high Glucose, 4,5 g/L), 40%FBS, 10%DMSO, 2mM L-Glutamin, 1% Pen/Strep

Das Kulturmedium wird entfernt, 2 mL EDTA zugefügt und für 6-8 min bei 37°C inkubiert. Es wird 1 mL Trypsin-EDTA zugefügt und für ca. 5-7 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird mit 5 mL Kulturmedium gestoppt. Die Zellen werden durch mehrmaliges Pipettieren vereinzelt, die Zellzahl bestimmt und die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Es erfolgt eine Zentrifugation bei 180 g, 10 min. Der Überstand wird entfernt und frisches Kulturmedium zugefügt. Es werden ca. 300.000 Zellen in eine neue Kulturflasche überführt und 5 mL frisches Kulturmedium zugegeben. Alle Volumina sind bezogen auf 25 cm² Zellkulturgefäßfläche.

Die Inkubation der Zellen erfolgt bei 37°C, 5,0% CO₂ im Brutschrank. Passagen erfolgten in der Regel bei 80-90% Konfluenz.

2.6.4 Kryokonservierung und Auftauen von Zellkulturen

Anlegen einer Kryokultur:

Das Kulturmedium wird entfernt und die Zellen werden passagiert. Nach der Zentrifugation wird das Pellet mit Kryomedium (Zusammensetzung, siehe jeweilige Zelllinie) mit einer Zelldichte von 1.000.000 Zellen/mL aufgenommen und zügig in Kryoröhrchen überführt (je 1.000.000 Zellen). Diese werden bei -80°C in einer Styropor-Box bei einer Kühlrate von ca. 1°C/min über Nacht eingefroren. Anschließend werden die Kulturen in flüssigen Stickstoff überführt.

Einsaat aus Kryokultur:

Die kryokonservierte Kultur wird leicht angetaut und dann schnell mit 37°C warmem frischem Medium (mind. 10 mL Kulturmedium/mL Kryokultur) aufgenommen. Die Zellen werden gewaschen (Zentrifugation 180 g, 10 min, RT) und anschließend in frischem Kulturmedium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche überführt. Die Inkubation der Zellen erfolgt bei 37°C, 5,0% CO₂ im Brutschrank. Nach 24 h sollte ein Mediumwechsel erfolgen.

2.7 Primärkulturen

2.7.1 Präparation und *Ex-vivo*-Kultivierung von Mäusehaut, Stadium p0/p4

Mausprimärkulturmedium: DMEM (high glucose), 10% FCS, 2mM L-Glutamin, 1% Pen/Strep

Mäuse werden dekapitiert und das dermale Gewebe des Rückens einschließlich Dermis mittels Skalpell vorsichtig abgelöst. Das Gewebe wird mit F-12-Medium gewaschen. Je nach Fragestellung wird das dermale Gewebe in Petrischalen bzw. Multiwellplatten mit Kulturmedium überführt. Gegebenfalls wird das Gewebe zuerst auf eine Zellulose-Mischester-Membran gezogen. Die Kultivierung erfolgt bei 37°C, 5,0%CO₂ im Brutschrank. Mediumswechsel sollte alle 24-48 h erfolgen.

2.8 *In-vitro*-Bestrahlung von Zell- und Gewebekulturen

2.8.1 Bestrahlung mit nahem Infrarot (NIR) und Rotlicht

Die zu untersuchenden Zellen werden je nach Fragestellung eingesät und über Nacht bei 37°C, 5,0% CO₂ inkubiert. Vor Bestrahlung wird das Kulturmedium entfernt und einmal mit PBS++ gewaschen. Die Bestrahlung erfolgt in carbonatfreiem DMEM (DMEM, -HCO₃, +10mM HEPES, pH 7,2; 2 mL/3,5 cm Petrischalen) unter Wasserkühlung (20+/-4°C; Abbildung 8-4,-5) für einen definierten Zeitraum. Zwischen Probe und Infrarotlampe (Philips IR250RH; Abbildung 8-1) ist ein 4 mm dickes gefrostetes Glas und ein 20 mm Wasserfilter (Abbildung 8-2) zwischengelagert. Dies gewährleistet ein homogenes Bestrahlungsfeld, sowie die Absorption von Wellenlängen größer 1400 nm. Der Leistungsfluss in Zellebene beträgt dabei 20 mW/m² (Bestimmung mittels IL1700 Thermopile Detector und Research Photometer; International Light, USA). Anschließend wird das Bestrahlungsmedium entfernt und die Zellen bis zur Weiterbehandlung in frischem Kulturmedium bei 37°C, 5,0% CO₂ weiterinkubiert. Bei Bedarf können auch Rotationskulturen auf dem integrierten Schüttler (Abbildung 8-3) bestrahlt werden.

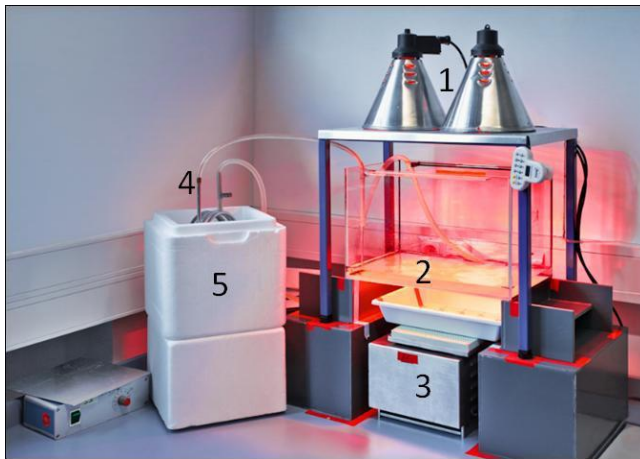


Abbildung 8: Bestrahlungsapparatur für nahes Infrarot (NIR). (1) Siccatherm 250W-Infrarotlampen. (2) Wasserbecken mit einer Füllhöhe von 2 cm. (3) Sockel mit Probenschale. (4) Kühlvorrichtung für das im Becken befindliche Wasser. (5) Behälter mit Eiswasser [1].

2.8.2 Bestrahlung mit Röntgenstrahlung

Die Bestrahlung von Zellen und Geweben mit Röntgenstrahlung erfolgt direkt im jeweiligen Kulturmedium. Als Quelle wird eine Philips MCN 165/796704 Röntgenröhre mit einer Wolfram Anode verwendet, wobei der gerichtete Strahlenaustritt über das oberhalb der Quelle liegende Berylliumfenster erfolgt. Die Proben werden auf ein 2 mm Alublech in definiertem Abstand zur Strahlenquelle gestellt. In der Regel wurden die Bestrahlung in einem Abstand von 30 cm zur Strahlenquelle mit einer Spannung von 90 kV und einer Stromstärke von 33,7 mA durchgeführt. Aus der resultierenden Dosisleistung von 2,6976 Gy/min wurde über die Bestrahlungsdauer die Dosis appliziert. Bei der Röntgenbestrahlung von Zellen auf Glas-Coverslips wurde zudem berücksichtigt, dass diese eine höhere, als die durch physikalische und chemische Dosimetrie bestimmte Dosis erhalten (Kegel et al., 2007).

2.9 *In-vivo*-Bestrahlung von p0/p4-Mäusen mit NIR+Rotlicht

Mauswürfe (p0 bzw. p4) werden auf 2 gleiche Gruppen, *Sham* und *Bestrahlt* verteilt. Bei ungerader Anzahl werden überzählige Tiere im Nest als *Nestkontrolle* belassen. Die Tiere jeder Gruppe werden auf den Bauch in unterteilbare, mit Nestmaterial ausgelegte Schalen gelegt. Glasstege zwischen den einzelnen Tieren verhindern dabei, dass diese sich gegenseitig abschatten. Die *Sham*-Gruppe wird mit Alufolie vorsichtig abgedeckt. Beide Gruppen werden unter die Infrarotlampe (Philips IR250RH) gestellt, wobei darauf geachtet wird, dass die Tiere beider Gruppen sich nicht auf den Rücken drehen. Zwischen Tier und Infrarotlampe ist ein 4 mm dickes gefrostetes Glas und ein 20 mm Wasserfilter zwischengelagert. Dies gewährleistet eine

homogenes Bestrahlungsfeld, sowie die Absorption von Wellenlängen größer 1400 nm. Der Leistungsfluss in Hautebene beträgt dabei 20 mW/cm² (Bestimmung mittels IL1700 Thermopile Detector und Research Photometer; International Light, USA). Nach der Bestrahlung werden die Tiere an den Vorderpfoten mittels Farbe entsprechend der Gruppenzugehörigkeit markiert und wieder zum Muttertier für 24 h ins Nest gegeben. Zur Weiterverarbeitung des Gewebes werden die Tiere abgetötet, das Gewebe isoliert, direkt verarbeitet oder *ex vivo* in Kultur genommen (siehe 2.7.1).

2.10 Wachstumskurven und Bestimmung der Indizes für Mitosen, Mitotische Katastrophen und Apoptosen

2.10.1 Wachstumskurven

Das Medium wird aus den Zellkulturen in 3,5 cm Petrischalen entfernt, einmal mit EDTA/PBS gewaschen (NIH/3T3 Mausfibroblasten) bzw. 5 min inkubiert (HaCaT humane Keratinozyten) und anschließend entfernt. Es werden 500 µL Trypsin-EDTA zugesetzt. Zum Inaktivieren des Trypsins werden 500 µL FBS zugesetzt und die Zellen durch mehrmaliges Pipettieren vereinzelt. Die Zellzahl pro Milliliter wird in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt. Jeder Meßpunkt wird im Replikat bestimmt.

2.10.2 Bestimmung Mitoseindex

Von auf Coverslips adhärenen Zellenkulturen wird das Medium entfernt und zweimal mit PBS gewaschen. Die Fixierung erfolgt mit 4%igem PFA/PBS für 10 min. Anschließend werden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und einer DAPI-Färbung (2.11.3) unterzogen. Die Cover Slips werden mit Mowiol/DABCO auf Objektträger eingedeckt und über Nacht unter Lichtausschluss getrocknet. Die Auswertung erfolgt im Fluoreszenzmikroskop. Es wird die Anzahl an Mitosen (alle Phasen summarisch) bezogen auf 1000 ausgewertete Zellen bestimmt.

2.10.3 Bestimmung Index mitotischer Katastrophen

Von auf Coverslips adhärenen Zellenkulturen wird das Medium entfernt und zweimal mit PBS gewaschen. Die Fixierung erfolgt mit 4%igem PFA/PBS für 10 min. Anschließend werden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und einer DAPI-Färbung (2.11.3) unterzogen. Die Cover Slips werden mit Mowiol/DABCO auf Objektträger eingedeckt und über Nacht unter Lichtausschluss getrocknet. Die Auswertung erfolgt im Fluoreszenzmikroskop. Es wird die Anzahl an Mitotischen Katastrophen bezogen auf 1000 ausgewertete Zellen bestimmt.

2.10.4 Bestimmung Apoptoseindex

Von auf Coverslips adhärennten Zellenkulturen wird das Medium entfernt und zweimal mit PBS gewaschen. Die Fixierung erfolgt mit 4%igem PFA/PBS für 10 min. Anschließend werden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und einer TUNEL-Färbung (2.11.2) unterzogen. Die Cover Slips werden mit Mowiol/DABCO auf Objektträger eingedeckt und über Nacht unter Lichtausschluss getrocknet. Die Auswertung erfolgt im Fluoreszenzmikroskop. Es wird die Anzahl an Apoptosen bezogen auf 1000 ausgewertete Zellen bestimmt.

2.11 Immunhistochemische Färbungen

2.11.1 Antikörperfärbung

Adhärennt gewachsene Zellen auf Coverslips werden 10 min in 4% PFA/PBS fixiert und anschließend 3 x 10 min in PBS gewaschen. Immunhistochemische Färbungen werden in der Regel wie folgt durchgeführt: der primäre Antikörper wird in Blocklösung (5% BSA, 0,1% Triton X 100 in PBS) verdünnt (BrdU: 1:500, G3G4, DSHB; 8-oxo-dG: 1:200, 15A3, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Germany; γ H2AX: 1:500 anti-phospho-Histone H2A.X (Ser139) antibody, Millipore, USA) und auf die fixierten, gewaschenen Zellen pipettiert. Inkubiert wird bei Raumtemperatur 70 min oder bei 4°C über Nacht. Nach Entfernen des primären Antikörpers durch 2 x 10 min waschen mit PBS erfolgt bei Raumtemperatur eine 60 minütige Inkubation des in Blocklösung verdünnten Fluorophor-konjugierten sekundären Antikörpers (Cy2, Cy3 oder Cy5, 1:200, Dianova, Germany). Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgt die Gegenfärbung der DNA mittels DAPI. Abschließend werden die Coverslips auf Objektträger mit Mowiol/Dabco oder Kaisers Glycerin Gelatine eingedeckt.

Für Anti-BrdU Färbungen werden die Zellen vor der Antikörperfärbung für 5 min in 2N HCl denaturiert und durch 3 x 10 min waschen in PBS neutralisiert.

2.11.2 TUNEL-Färbung auf Cover Slips

Die auf Cover Slips fixierten Zellen werden einmal mit PBS⁻ gewaschen. Zur Permeabilisierung wird 5 min in 0,2 % TritonX-100/PBS⁻ inkubiert. Anschließend wird 2 x 5 min in PBS⁻ gewaschen. Es werden ca. 100 μ L/CS Equilibrierungspuffer zugegeben und 10 min bei RT inkubiert. Unter Lichtausschluss werden 50 μ L Inkubationspuffer (45 μ L Equilibrierungspuffer, 5 μ L Nukleotid-Mix, 1 μ L rTDT-Enzym) zugegeben und für 60 min bei 37°C in feuchter Kammer inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wird für 15 min mit 2x SSC-Puffer bei RT gewaschen. Anschließend wird 3 x 5 min in PBS⁻ gewaschen. Es folgt eine

DAPI-Färbung für 1-2 min (0,1 g/mL). Die Färbelösung wird entfernt und 2 min mit dest. H₂O gewaschen. Anschließend werden die Cover Slips mit Mowiol/DABCO auf OTs gedeckt und über Nacht unter Lichtausschluss getrocknet. Die Auswertung erfolgt im Fluoreszenzmikroskop.

2.11.3 DAPI-Färbung

Die auf Cover Slips oder Objektträgern fixierten Zellen werden einmal mit PBS⁻ gewaschen. Anschließend werden 200-300 µL DAPI-Färbelösung (0,1 µg/mL) zugefügt und für 10 min unter Lichtausschluss gefärbt. Die Färbelösung wird entfernt und einmal mit dest. H₂O gewaschen. Anschließend werden die Cover Slips mit Mowiol/DABCO auf OTs gedeckt und über Nacht unter Lichtausschluss getrocknet. Die Auswertung erfolgt im Fluoreszenzmikroskop.

2.11.4 Giemsa-Färbung

Fixierte Zellen auf Objektträgern oder in Zellkulturgefäßen werden für 10 min in 10%iger Giemsa-Lösung inkubiert. Anschließend werden die Präparate kurz mit WEISE-Puffer gespült und für 10 min in frischem Puffer gewaschen. Die Präparate werden über Nacht bei RT getrocknet. Die Einbettung von Giemsa-gefärbten Objektträgern erfolgt mit Eukitt.

2.12 FACS Analysen

2.12.1 Zellzyklus

Aus den zu untersuchenden Zellkulturen werden Einzelzellsuspensionen hergestellt, in 70%igem eiskaltem Ethanol fixiert und anschließend einmal in PBS gewaschen. Die Zellen werden 30 min in einer Propidium Iodid Färbelösung (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) mit RNase (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) inkubiert. Anschließend wird die Zellzyklusverteilung über den DNA-Gehalt der Zellen im FACS bestimmt.

2.12.2 AnnexinV FACS Analysen

Die Verteilung früher und später apoptotischer Ereignisse wird über AnnexinV FACS Analysen (Vermes et al., 1995) ermittelt. Aus den zu untersuchenden Zellkulturen werden zunächst Einzelzellsuspensionen hergestellt. Diese werden analog dem Herstellermanual mit einem AnnexinV-FITC Antikörper (PromoKine, Deutschland) in *Annexin Binding Buffer* (1:1.000) für 15 min inkubiert und anschließend mit Propidium Iodide (100 ng/ μL) gegengefärbt. Die Analyse erfolgt im FACS wobei frühe Apoptosen AnnexinV-positiv und späte Apoptosen und Nekrosen AnnexinV/Propidium Iodid-positiv gefärbt sind.

2.12.3 FACS Analysen reaktiver Sauerstoffspezies

Zur Detektion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) werden die Zellen in Einzelzellsuspension in 25 μM 2',7'-Dichlorofluorescein diacetat (DCFDA) in PBS für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend in PBS gewaschen. Nach erfolgter Behandlung wird der ROS-Level über die Fluoreszenzintensität mittels FACS Analyse zu definierten Zeitpunkten ermittelt.

2.12.4 FACS Analysen mitochondrialer Masse

Zur Detektion der mitochondrialen Masse werden die Zellen in Einzelzellsuspension in 500 nM *MitoTracker Green* in Kulturmedium für 10 min bei 37°C inkubiert und anschließend in PBS gewaschen. Nach erfolgter Behandlung wird die mitochondriale Masse über die Fluoreszenzintensität mittels FACS Analyse ermittelt.

2.13 Proteinchemische Analysen

2.13.1 Aufschluss und Konzentrationsbestimmungen

Gewebe oder Zellpellets werden in 150 μ L Proteinaufschlusspuffer, welcher zur Phosphataseinhibition 1 mM Na_3VO_4 enthält, mittels Ultraschallsonde bei 80% Leistung 2 x 10 sec auf Eis aufgeschlossen. Die Proteinkonzentration der Extrakte erfolgt photometrisch über eine Bradfordanalyse. Dazu werden 200 μ L Bradford-Reagenz zu 800 μ L MilliQ- H_2O und 1 μ L Proteinextrakt pipettiert und gemischt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wird die Absorption bei 595 nm im Photometer gemessen. Die Konzentration wird anhand des zusätzlich ermittelten Faktors der Eichgeraden mit definierten BSA-Konzentrationen errechnet.

2.13.2 Western Blot

Proteinextrakte werden mit 5x Lämmli Puffer mit 5% β -Mercaptoethanol bei 95°C für 5 min aufgeköcht und anschließend auf Eis abgekühlt. Aliquots aus 80 μ g Protein werden in einer SDS-PAGE bei 100 V aufgetrennt und anschließend auf eine 0,2 nm Nitrozellulosemembran im Wet-Blot-Verfahren 1 h bei 300 mA geblottet. Der Blot wird durch Anfärben mit 0,1% Ponceau-S in 5%iger Essigsäure überprüft. Anschließend wird die Membran in dest H_2O und 2 x 10 min in TBST gewaschen. Nach dem Blocken für 1 h in 5% Milchpulver in TBST erfolgt die Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen in TBST folgt die Inkubation mit speziesspezifischem HRP-konjugiertem Sekundärantikörper in 2,5%igem Milchpulver in TBST für 1 h bei RT. Die Banden werden über Chemolumineszenz mit LumiLight (Roche) oder ECL-Detektionslösung (Merck) detektiert. Spezifische Banden werden über ImageJ in Bezug auf parallel detektierte Housekeeping-Proteine wie GAPDH quantifiziert.

2.14 Molekularbiologische Methoden

2.14.1 RNA Isolation

Die Isolation von Ribonukleinsäuren aus Zellkulturen und Geweben erfolgt mittels *Masterpure Complete DNA-RNA-Purification-Kit* (Epicentre, USA) analog Manual des Herstellers.

Hierzu werden 1-5 mg Gewebe oder $0,5-1 \times 10^6$ Zellen je Versuch eingesetzt. Die Proben werden mit 150 μL „Tissue and Cell Lysis Solution“ versetzt und mit einer Ultraschallsonde 15 sec auf Eis aufgeschlossen. Anschließend werden 1 μL Proteinase K in 150 μL „Tissue and Cell Lysis Solution“ zur aufgeschlossenen Probe zugegeben und gründlich gemischt. Es erfolgt eine Inkubation bei 65°C für 15 min, wobei alle 5 min die Probe gevortext wird. Anschließend wird diese für 3-5 min auf Eis gestellt. Es werden 150 μL „MPC Protein Precipitation Reagent“ zu 300 μL lysierter Probe pipettiert und 10 sec rigoros gevortext. Anschließend wird 10 min bei 4°C mit $> 10.000g$ zentrifugiert. Der Überstand wird in neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet verworfen. Es werden 500 μL 100%iger Isopropanol zugefügt, 30-40 x invertiert und erneut 10 min bei 4°C mit $> 10.000g$ zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in 200 μL DNase I-Solution (5 μL RNase-free DNase I, 195 μL DNase-Puffer) resuspendiert und bei 37°C für bis zu 30 min inkubiert. Zur Fällung der DNase werden 200 μL „2x T und C Lysis Solution“ zugegeben und 5 sec gevortext. Anschließend werden 200 μL „MPC Protein Precipitation Reagent“ zupipettiert, 10 sec gevortext und für 3-5 min auf Eis inkubiert. Es folgt eine Zentrifugation für 10 min bei 4°C mit $> 10.000g$. Der resultierende Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet verworfen. Zur Fällung der RNA werden 500 μL Isopropanol zugefügt, 30-40 x invertiert und für 10 min bei 4°C mit $> 10.000g$ zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt ohne das Pellet zu lösen. Dieses wird zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen. Der Ethanol wird vollständig durch Trocknen im Univac entfernt. Die RNA wird in 10-35 μL TE-Puffer und 1 μL „RiboGuard RNase Inhibitor“ gelöst. Die Konzentration und Reinheit wird spektrometrisch im Nanodrop (Peglab) bestimmt. Die RNA wird direkt in die cDNA-Synthese eingesetzt oder bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.14.2 cDNA Synthese

cDNA Synthese zur RT-PCR-Analyse wird mittels *Revert Aid First Strand cDNA-Kit* (Fermentas, St. Leon-Roth) analog Herstellermanual wie folgt durchgeführt. Es wird je Probe ein Ansatz aus 1 μg total-RNA, 1 μL Oligo(dT)₁₈ Primer zur spezifischen Transkription von mRNA und DEPC-MilliQ-H₂O ad 12 μL hergestellt. Zu diesem werden 4 μL 5xReaction Buffer, 1 μL RiboLock™ RNase Inhibitor (20 u/ μL), 2 μL 10 mM dNTP Mix sowie 1 μL RevertAid™ M-

MuLV Reverse Transkriptase (200 u/ μ L) zugefügt. Der Gesamtreaktionsansatz von 20 μ L wird im Thermocycler 60 min bei 42°C inkubiert und anschließend durch 5minütiges Erhitzen auf 70°C abgestoppt. Die transkribierte cDNA wird direkt in eine PCR eingesetzt oder bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.14.3 RT-PCR Analyse

mRNA-Expressionslevel der Zielgene werden über RT-PCR-Analyse aus der transkribierten cDNA (2.14.2) mit dem *TopTaq Polymerase Kit* (Qiagen, Hilden) und Gen-spezifischen Primern ermittelt. Die PCR-Reaktion wird analog dem Herstellermanual wie folgt durchgeführt. Für mehrere Proben wird ein Mastermix mit je 3 μ L 10xPCR-Puffer, 6 μ L Q-Solution, 3 μ L 10x CoralLoad, 1 μ L 10 mM dNTP-Mix, 1,5 μ L Forward-Primer (10 pmol/ μ L), 1,5 μ L Reverse-Primer (10 pmol/ μ L), 0,2 μ L TopTaq (5 u/ μ L) sowie DEPC-MilliQ-H₂O ad 28 μ L hergestellt. Zu 28 μ L Mastermix werden 2 μ L cDNA zupipettiert und die Reaktion im Thermocycler nach Standardprotokoll wie folgt amplifiziert. Als initialer Schritt erfolgt eine Denaturierung für 5 min bei 94°C. Anschließend erfolgen im Zyklus 30 sec Denaturierung bei 94°C, 30-45 sec Annealing der Primer bei einer spezifischen Temperatur (in der Regel 4°C unter der Schmelztemperatur der Primer) mit anschließender Elongation für 1 min bei 72°C. Dieser Zyklus wird je nach zu erwartender Expression 25-30mal wiederholt. Im Anschluss erfolgt eine finale Elongation für 10 min bei 72°C. Nach Abschluss der Reaktion wird der Ansatz auf 4°C gekühlt. Die Reaktion kann bis zur analytischen Agarosegelelektrophorese bei -20°C gelagert, oder direkt auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen und analysiert werden.

2.15 Automatisierte Auswerteverfahren

2.15.1 Image Analyse von immunohistochemischen Färbungen

Die Image Analyse der Fluoreszenzintensitäten der BrdU- und 8-oxo-dG-Studien wurden mittels MetaCyte Software (Metasystems, Deutschland) durchgeführt. Zur Analyse werden die immunhistogefärbten Präparate mit einem Zeiss Observer A1 Mikroskop, ausgerüstet mit einer CCD Kamera (Zeiss, Jena), eingescannt. Bilder der zu analysierenden Zellen werden automatisch mittels MetaCyte Software aufgenommen und die mittlere Fluoreszenzintensität innerhalb des Kerns anhand einer Kontur des DAPI-Signals bestimmt.

2.15.2 Image Analyse von Agarosegelelektrophese und Western Blot Analysen

Zur Analyse der Bandenintensitäten werden die Agarosegele und Western Blots über die ChemiCapt Fluoreszenz- und Chemolumineszenzsoftware aufgenommen. Die Image Analyse der Bandenintensitäten werden mittels ImageJ (NIH, USA) Gelanalysetool durchgeführt. Die ermittelten Intensitätslevel werden auf parallel bestimmte Haushaltsgene/-proteine normiert.

2.16 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgt mittels *GraphPad Prism Software (Version 3.02)*. *Unpaired two-tailed students t-tests* wurden für die Quantifizierung von Mitotischen Katastrophen (MCs), BrdU-Analysen, Mitotischen Indizes (1.000 Zellen je Dosis je Versuch) und γ H2AX Analysen (50 Zellen für röntgenbestrahlte Proben, 100 Zellen für alle weiteren) verwendet. *One-way ANOVAs* mit *Tukey-test* wurden für die Analyse von MC-Langzeitstudien (1.000 Zellen), für TUNEL-Analysen (500 Zellen), 8-oxo-dG (250 Zellen) und FACS-Analysen (30.000 Zellen) verwendet. Für alle statistischen Auswertungen wurden ein Konfidenz Intervall (CI) von 95% mit statistischer Signifikanz für * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ und *** $P < 0.001$ festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Induktion mitotischer Katastrophen durch NIR-Vorbehandlung

Mitotische Katastrophen (MC) sind ein Hinweis für entartete Mitosen und genetische Instabilität in Zellen. Zur Analyse des Einflusses von naher Infrarotstrahlung oder auch einer Kombination dieser mit Röntgenbestrahlung wurden die Raten an mitotischen Katastrophen 24 h nach Röntgenexposition bestimmt (siehe Abbildung 9).

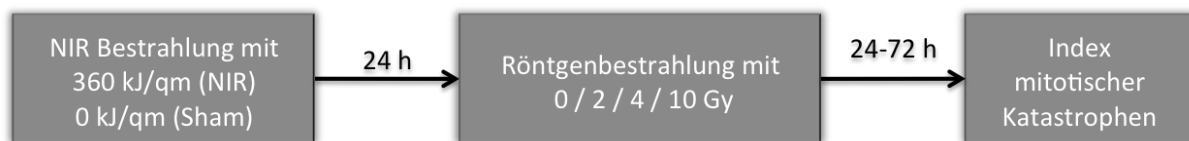


Abbildung 9: Experimenteller Ablauf zur Bestimmung des Indizes mitotischer Katastrophen.

Ohne Einwirkung ionisierender Röntgenstrahlung sind mitotische Katastrophen (MCs) nahezu nicht nachweisbar, weder in Sham-Kontrollen noch in NIR-behandelten Zellen (Abbildung 10). Im Gegensatz dazu steigt die Rate an MCs in klassischer Dosis-Wirkungsbeziehung mit steigender Röntgendosis, sowohl in Fibroblasten als auch in retinalen Vorläuferzellen (Abbildung 10a, b; schwarze Säulen). In Keratinozyten liegt die effektivste Dosis zur Induktion von mitotischen Katastrophen bei 4 Gy (Abbildung 10c). Eine Doppelbehandlung mit 360 kJ/qm NIR gefolgt von einer Röntgenexposition 24 h später, fördert immens die Bildung mitotischer Katastrophen. 3T3 Fibroblasten zeigen hierbei einen leichten, aber signifikanten Anstieg nach 4 Gy bis hin zu einer annähernden Verdoppelung an MCs nach 10 Gy (Abbildung 10a). In NIR-behandelten R28 Vorläuferzellen ist ein leichter Anstieg nach 2 Gy und eine mehr als verdoppelte Rate an MCs nach 4 Gy detektierbar (Abbildung 10b). Ähnliche Verhältnisse zeigen sich auch in HaCaT nach 4 und 10 Gy (Abbildung 10c), wobei hier ein genereller Rückgang der Rate mit Erhöhung der Dosis auf 10 Gy vorliegt.

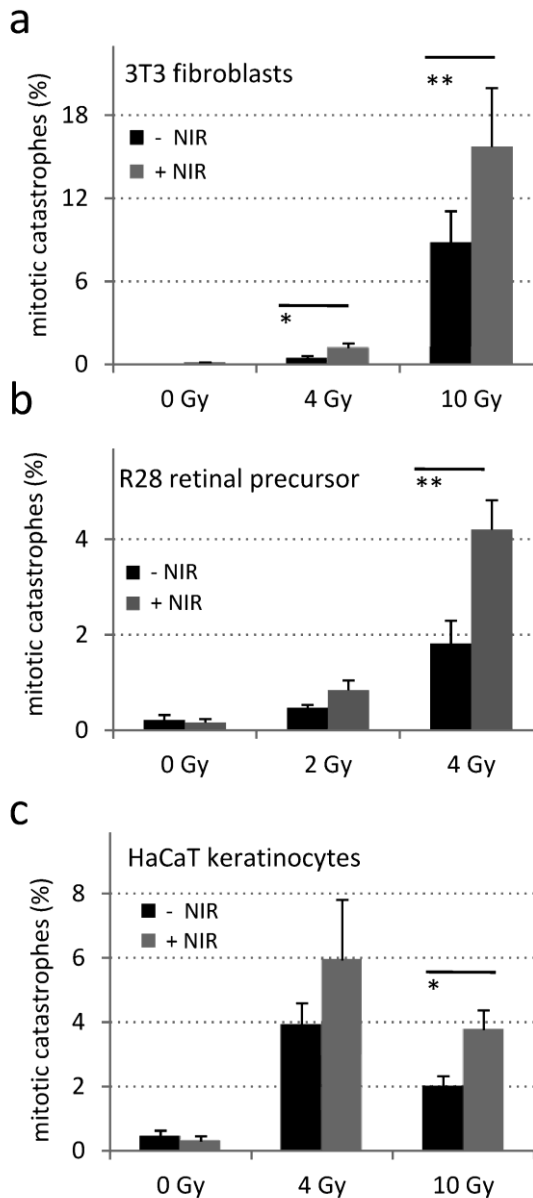


Abbildung 10: Vorbehandlung mit naher Infrarotstrahlung fördert die Entstehung mitotischer Katastrophen (MCs) 24 h nach Röntgenexposition. Die Rate an MCs erhöht sich mit steigender Röntgendosis (schwarz) in Fibroblasten (a), R28 Zellen (b) und Keratinozyten (c). NIR-Behandlung allein (0 Gy, graue Säulen) induziert keine MCs, erhöht jedoch in Kombination mit Röntgenstrahlung signifikant deren Anzahl im Vergleich zur reinen Röntgenstrahlung. In Fibroblasten (a) ist ab einer Dosis von 4 Gy ein signifikanter Einfluss der NIR-Behandlung feststellbar. In R28 Zellen (b) ist bereits bei 2 Gy ein leichter Anstieg feststellbar, ab 4 Gy zeigt sich eine signifikante Erhöhung. In HaCaT Zellen (c) ist die Erhöhung erst ab 10 Gy signifikant.

Die Daten stellen den Mittelwert aus mehreren unabhängigen Versuchen (3T3/HaCaT: n=4, R28: 2 Gy n=4, Übrige: n=7) \pm SE dar. Die Statistische Analyse erfolgte mittels Chi-Quadrat Test (CI=95%, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

Um festzustellen, ob MCs ausschließlich während der ersten 24 h nach Röntgenbestrahlung entstehen, wurden die Raten an MCs zusätzlich nach 48 und 72 h sowohl in R28 als auch in HaCaT Zellen bestimmt (Abbildung 11). Hierfür wurden ausschließlich die zur Induktion von mitotischen Katastrophen effizienten Röntgendosen appliziert.

In Abwesenheit ionisierender Röntgenstrahlung verbleiben die Spontanraten an MCs sowohl in Sham-Kontrollen als auch in NIR-bestrahlten Zellen gleichmäßig niedrig (Abbildung 11a,b). Im Gegensatz hierzu nimmt die Anzahl an MCs nach einer Röntgendosis von 4 Gy in R28 (Abbildung 11a) bzw. 10 Gy in HaCaT (Abbildung 11b) kontinuierlich zu. Dabei bewirkt eine 360 kJ/qm NIR-Vorbehandlung einen konstanten starken Anstieg in beiden Zelllinien zu allen untersuchten Zeitpunkten (Abbildung 11a,b).

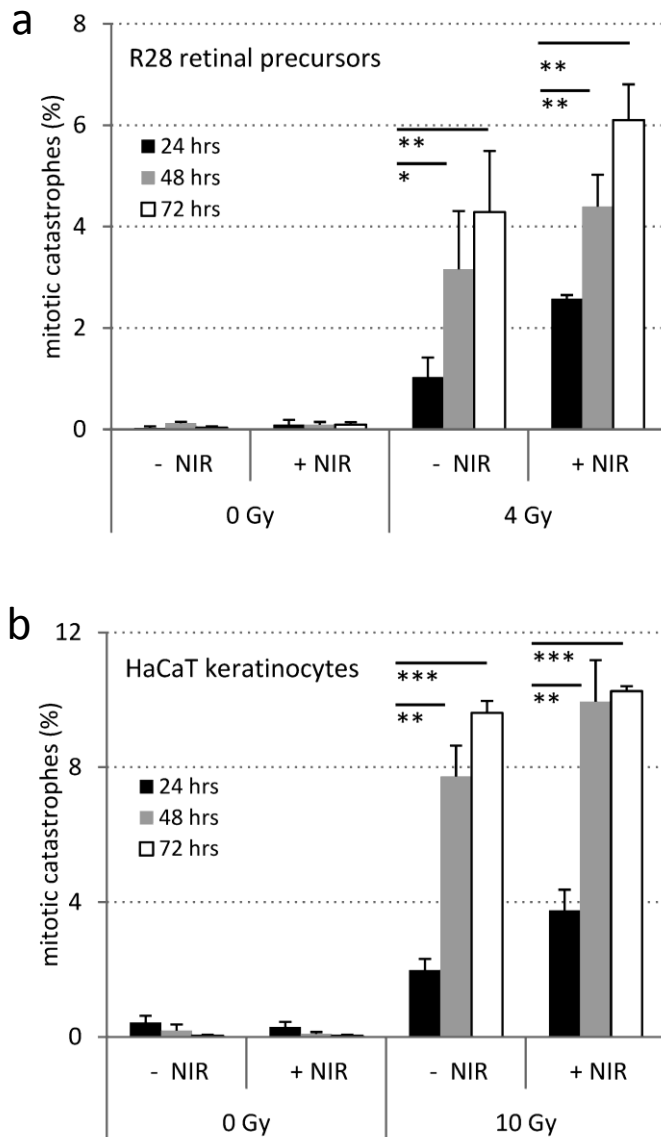


Abbildung 11: Höhere Raten an mitotischen Katastrophen (MCs) durch Vorbehandlung mit nahem Infrarot sind bis zu 72 h nach Röntgenbestrahlung nachweisbar. Raten an MCs wurden nach 24 h (schwarz), 48 h (grau) und 72 h nach 4 Gy Röntgenstrahlung in R28 Vorläuferzellen (a) und 10 Gy in Keratinozyten (b) bestimmt. Die Bildung mitotischer Katastrophen endete nicht nach 24 h sondern stieg in beiden Zelllinien bis 48 h, in R28 Zellen sogar bis 72 h, weiter an. Eine Behandlung ausschließlich mit 360 kJ/qm NIR hatte keinen Einfluss auf die Spontanraten an MCs.

Die Daten stellen den Mittelwert aus mehreren unabhängigen Versuchen ($n=3$) \pm SE dar. Die Statistische Analyse erfolgte mittels Chi-Quadrat-Test (CI=95%, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$).

3.2 Strahleninduzierte Apoptose

Da durch Röntgenstrahlung schwere DNA Schäden verursacht werden, die schlussendlich zum Zelltod führen können, wurden die Einflüsse von Einzel- und Kombinationsbestrahlung mit NIR auf das Zellüberleben (siehe Abbildung 12) untersucht.

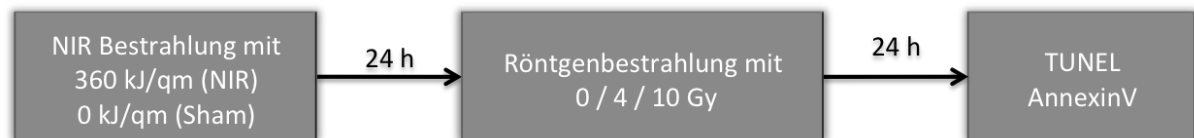


Abbildung 12: Experimenteller Ablauf zur Bestimmung der Apoptoseraten.

Die Analyse der späten apoptotischen Ereignisse über eine *Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling* (TUNEL) Markierung (Abbildung 13) zeigt 24 h nach der Röntgenbestrahlung sowohl in retinalen Vorläuferzellen als auch in Fibroblasten weniger als 1% TUNEL-positive Zellen mit minimalen Varianzen zwischen den verschiedenen Behandlungsvarianten.

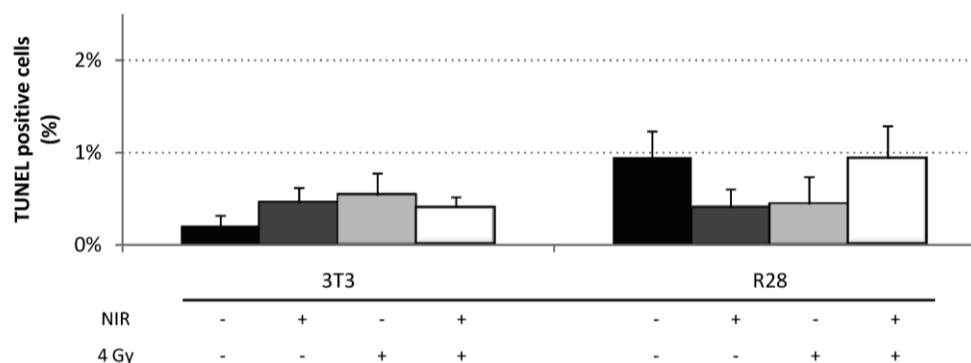


Abbildung 13: Nahe Infrarotstrahlung zeigt keinen Einfluss auf die Induktion von späten apoptotischen Ereignissen nach Röntgenbestrahlung. Späte apoptotische Ereignisse wurden über das *Terminale Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling* (TUNEL) 24 h nach Röntgenexposition bestimmt. Die Varianzen der Raten an TUNEL-positiven Zellen sind insignifikant in allen Behandlungen, sowohl in Fibroblasten (links) als auch in R28 Vorläuferzellen (rechts, schwarz: Sham, dunkelgrau: 360 kJ/qm NIR-Bestrahlung, hellgrau: 24 h nach 4 Gy Röntgen, weiß: Kombination von NIR-Vorbehandlung mit 4 Gy Röntgen). Die Daten stellen die Mittelwerte der Populationsverteilungen dar ($n=3$) \pm SE. Die Statistische Analyse erfolgte mittels *One-Way Anova* in Kombination mit *Tukey-Test* (CI=95%, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$).

Da man die TUNEL-Markierung Apoptosen erst in einer sehr späten Phase detektieren kann, wurden zur Bestimmung von frühen und späten apoptotischen Ereignissen zusätzlich FACS Analysen nach AnnexinV- und Propidiumjodid Markierung in Fibroblasten durchgeführt (Abbildung 14). Die Röntgenbestrahlung mit 10 Gy zeigt nur geringe, aber signifikante

Erhöhungen früher und später apoptotischer / nekrotischer Ereignisse, wobei eine zusätzliche Vorbehandlung mit NIR keinerlei nachweisbaren Einfluss hat. Beide apoptotischen Ereignisse werden durch Behandlung der Zellen mit Actinomycin D als Positivkontrolle (Abbildung 14) deutlich erhöht.

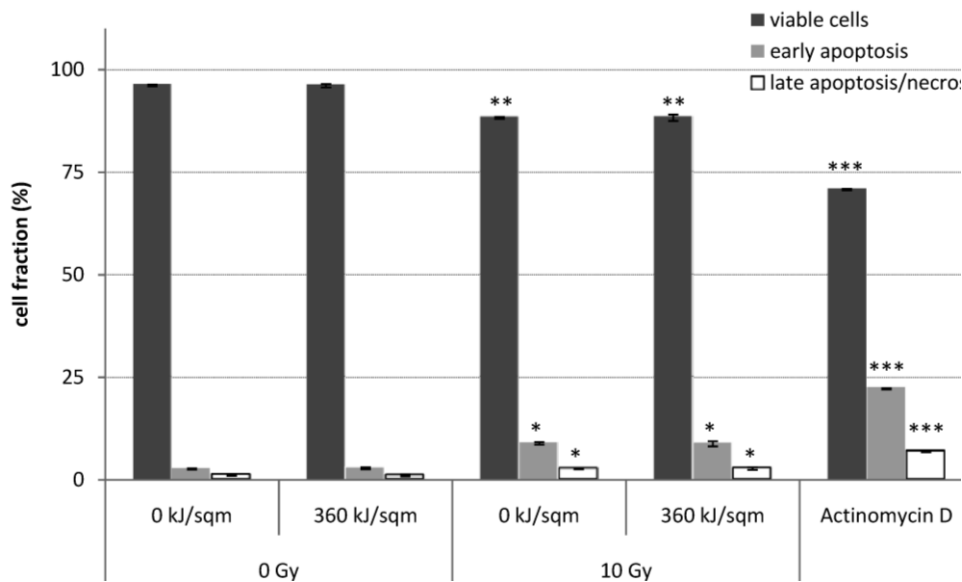


Abbildung 14: Vorbehandlung mit naher Infrarotstrahlung hat keinen Einfluss auf die durch Röntgenexposition induzierte frühe Apoptose. Die FACS Analysen apoptotischer Ereignisse in Fibroblasten durch AnnexinV-Markierung zur Indikation von frühen apoptotischen Phasen, sowie Doppelfärbung mit Propidium Jodid für fortgeschrittene apoptotische / nekrotische Phasen zeigen keinen Effekt durch NIR-Bestrahlung. Sowohl reine Röntgenstrahlung, als auch deren Kombination mit NIR reduzierten den Anteil viabler Zellen (schwarz) unter Erhöhung von sowohl frühen (grau) als auch späten apoptotischen / nekrotischen Ereignissen signifikant. Es ist jedoch keine signifikante Veränderung durch die NIR-Vorbehandlung feststellbar. Die Daten stellen die Mittelwerte der Populationsverteilungen dar ($n=3$) \pm SE Die Statistische Analyse erfolgte mittels *One-Way Anova* in Kombination mit *Tukey-Test* (CI=95%, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$).

Da sich trotz der Erhöhung der MC-Raten durch die Doppelbestrahlung mit Röntgen und NIR keine Veränderungen in der Apoptoserate zeigten, wurde das Level des Apoptoseantagonisten Bcl2 mittels Westernblot analysiert. (siehe Abbildung 15).

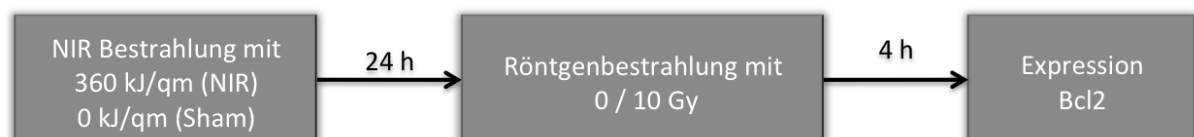
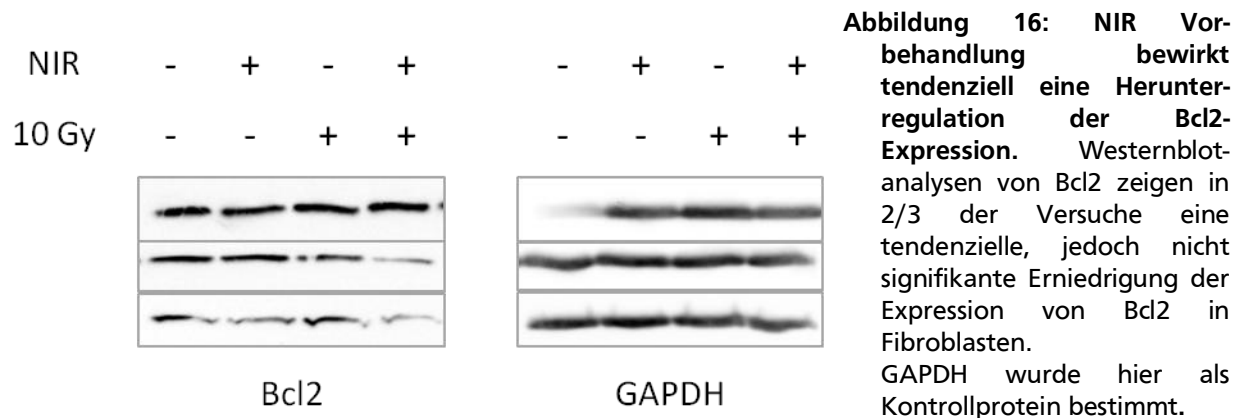


Abbildung 15: Experimenteller Ablauf zur Bestimmung der Bcl2-Expression.

Während sich in einem der drei unabhängigen Versuche keinerlei Änderung durch eine der Behandlungsvarianten, NIR, Röntgen und oder die Kombination aus beiden zeigt, konnte in

zwei Versuchen eine tendenzielle Herunterregulation von Bcl2 bei der kombinierten Bestrahlung von NIR und Röntgen (Abbildung 16) beobachtet werden. Die densitometrische Auswertung und Normierung gegen GAPDH zeigte jedoch, dass diese Regulation nicht signifikant ist.



3.3 Klonogenes Überleben

Mitotische Katastrophen werden in der Literatur häufig als eine Variante des proliferativen Zelltods beschreiben, welche langfristig nicht nur eine Reduktion des Zellüberlebens generell hervorrufen, sondern auch Auswirkungen auf das klonogene Überleben haben können. Das klonogene Überleben ermöglicht eine langfristige Betrachtung von gestressten bzw. geschädigten Zellen, die nicht in den Zelltod gehen. Dabei lassen sich ausschließlich metabolisch aktive Zellen von Zellen unterscheiden, die zudem in der Lage sich zu teilen und mehrere Generationen teilungsfähiger Nachkommen zu bilden.

Es wurde daher das klonogene Überleben im *Clonogenic Cell Survival Assay* analysiert, welches zeigen sollte, ob eine NIR-Vorbehandlung zu einer Reduktion bzw. Veränderung des klonogenen Überlebens nach Röntgenexposition mit 4 und 10 Gy beiträgt (siehe Abbildung 17).

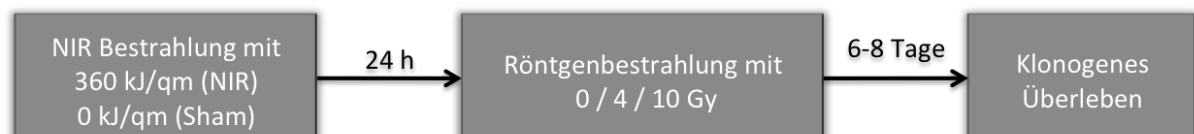


Abbildung 17: Experimenteller Ablauf zur Bestimmung des klonogenen Überlebens.

Weder in retinalen Vorläuferzellen noch in Fibroblasten konnte eine Reduktion des klonogenen Überlebens in NIR vorbehandelten Zellen festgestellt werden. Jedoch lässt sich in R28 Zellen eine signifikante Erhöhung des klonogenen Überlebens nach 4 Gy Röntgen durch die Vorbehandlung mit NIR nachweisen (Abbildung 18).

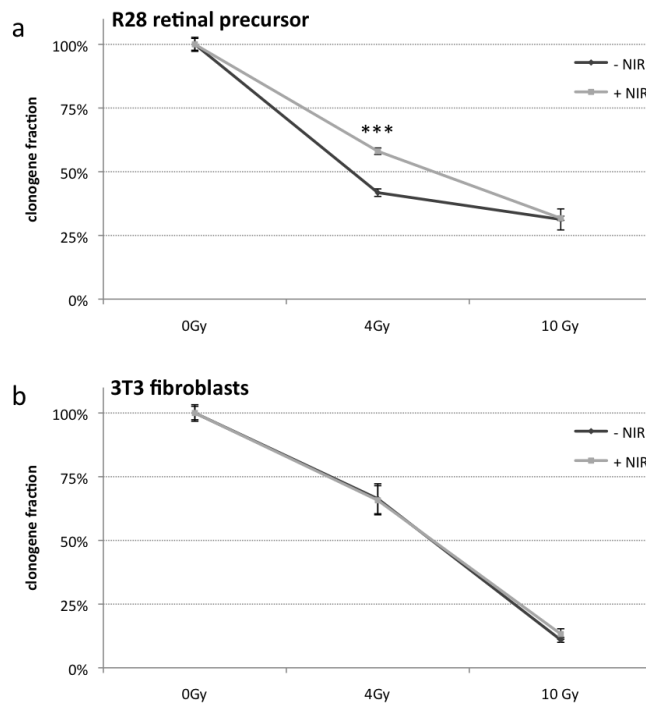


Abbildung 18: NIR-Vorbehandlung hat einen positiven Einfluss auf das klonogene Überleben in Röntgenbestrahlten R28 retinalen Vorläuferzellen, jedoch keinen Einfluss in NIH/3T3. (a) In NIR-vorbehandelten R28 Vorläuferzellen ist das klonogene Überleben nach einer Dosis von 4 Gy Röntgen signifikant erhöht. Nach einer Dosis von 10 Gy ist kein Einfluss der NIR-Behandlung mehr feststellbar. (b) In NIH/3T3-Fibroblasten zeigen sich keine signifikanten Veränderungen auf das klonogene Überleben durch NIR-Vorbehandlung. Die Daten stellen die Mittelwerte der Populationsverteilungen dar (n=3, im Triplikat) ± SE. Die Statistische Analyse erfolgte mittels *twotailed students t-test* (CI=95%, *** P<0.001).

3.4 Einfluss naher Infrarotstrahlung auf Zellzyklus und Proliferation

3.4.1 Zellzyklus, mitotischer Index nach NIR

Da DNA-Schäden und damit einhergehende aberrante Mitosen als Ursache für die Bildung mitotischer Katastrophen vermutet werden, ist die Anzahl an Zellen, die in der Lage sind nach einer NIR-Behandlung in Mitose zu gehen, relevant für die Bildung von MCs nach einer nachfolgenden Röntgenbestrahlung. Daher wurden die Zellzyklusverteilungen und die mitotischen Indizes 24 h nach der NIR-Bestrahlung, entsprechend dem Zeitpunkt, an dem die Röntgenstrahlung erfolgen würde, bestimmt (siehe Abbildung 19).

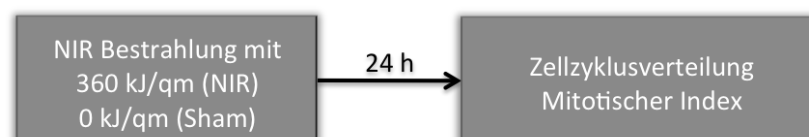


Abbildung 19: Experimenteller Ablauf zur Bestimmung der Zellzyklusverteilung, sowie des mitotischen Index nach NIR.

Sowohl in 3T3 Fibroblasten als auch in HaCaT Zellen sind keine signifikanten Veränderungen zum Kontrolllevel feststellbar (Abbildung 20). Dies weist darauf hin, dass gleiche Raten sich teilender Zellen einer nachgeschalteten Röntgenbestrahlung ausgesetzt sind.

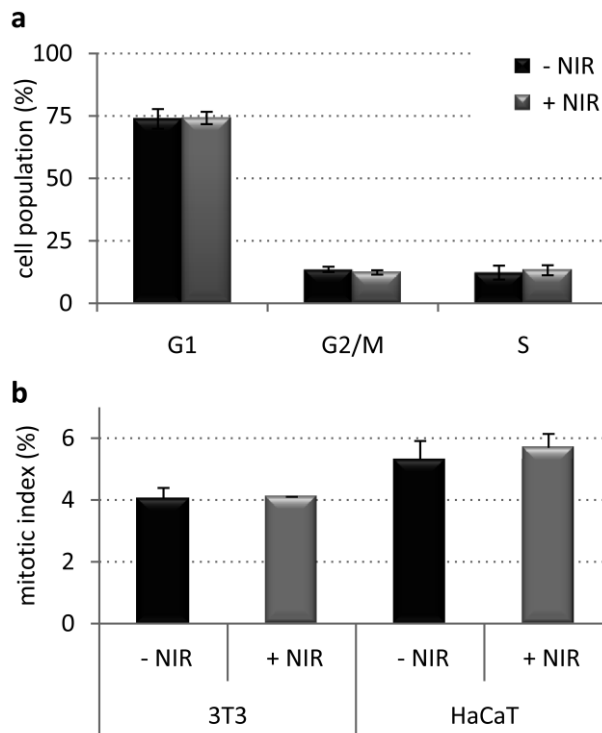


Abbildung 20: NIR Bestrahlung nimmt keinen Einfluss auf den Zellzyklus oder den mitotischen Index. (a) In Zellzyklus FACS-Analysen von NIH/3T3 Fibroblasten in Sham-Kontrollen (-NIR, schwarz) sowie 24 h nach Bestrahlung mit 360 kJ/qm NIR (+NIR, grau) sind für keine der Zellzyklusphasen Veränderungen feststellbar. (b) Die mitotischen Indizes in Fibroblasten (links) und Keratinozyten (rechts) wurden sowohl für Sham-Kontrollen, als auch für mit 360 kJ/qm NIR bestrahlte Zellen, 24 h nach Bestrahlung bestimmt. Die Bestrahlung zeigt in keiner der beiden Zelllinien signifikante Veränderungen. Die Daten stellen den Mittelwert aus mehreren unabhängigen Versuchen ($n=3$) \pm SE dar. Die Statistische Analyse erfolgte mittels *two tailed students t-test* (CI=95%, *** $P<0.001$).

3.4.2 Zellzyklus, mitotischer Index nach Kombination von NIR mit Röntgen

Die Entstehung mitotischer Katastrophen steht mit großer Wahrscheinlichkeit im Zusammenhang mit der Inaktivierung von Zellzykluscheckpoints und damit der Befähigung geschädigter Zellen in die Mitose zu laufen. Zellzyklus FACS-Analysen für NIH/3T3 Fibroblasten 24 h nach Röntgenexposition, also zum Analysezeitpunkt eines Großteils der hier untersuchten Endpunkte, zeigen in NIR bestrahlten Zellen einen vermehrten, jedoch nicht signifikanten Eintritt von G1-Zellen in die S-Phase (Abbildung 21a). Die Bestrahlung mit 4Gy Röntgen zeigt eine Verschiebung in Richtung G1 und eine Reduktion der G2-Phase. In Kombination mit 4 Gy Röntgen bewirkt die Vorbehandlung mit 360 kJ/qm NIR dagegen eine deutliche Verschiebung in Richtung G2/M, wobei die Zahl von Zellen in der S-Phase unverändert bleibt (Abbildung 21b). 24 h nach der Exposition mit 10 Gy Röntgen verhält sich die Zellzyklusverteilung nahezu analog der Kontrolle, mit Ausnahme der S-Phase, die reduziert ist. In den kombiniert bestrahlten Populationen ist die Verteilung nahezu analog zur

Verteilung nach 4 Gy, wobei sich jedoch generell vermehrt Zellen in G2/M befinden und die S-Phase langsam leer läuft (Abbildung 21c).

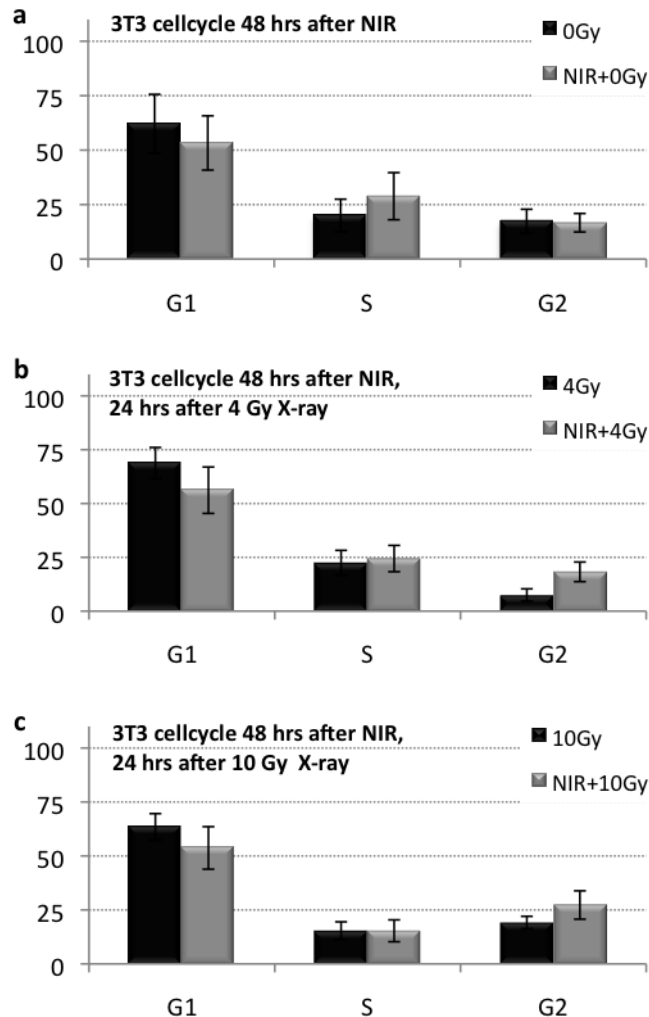


Abbildung 21: NIR-Vorbehandlung erhöht die Population an G2/M Zellen 24 h nach Röntgenexposition. (a) Zellzyklus FACS-Analysen für NIH/3T3 Fibroblasten zeigen in NIR bestrahlten einen vermehrten, jedoch nicht signifikanten Eintritt von G1-Zellen in die S-Phase 48 h nach der NIR-Bestrahlung. (b) In Kombination mit 4 Gy Röntgen bewirkt die Vorbehandlung mit NIR eine Verschiebung in Richtung G2/M. (c) Exposition mit 10 Gy Röntgen verhält sich analog 4 Gy, wobei sich generell vermehrt Zellen in G2/M befinden. Die Daten stellen den Mittelwert aus mehreren unabhängigen Versuchen (n=3) \pm SE dar.

3.4.3 Veränderung der Generationsdauer durch nahes Infrarot

Längerfristige Einflüsse auf die Proliferation lassen sich nur ungenügend über BrdU-Aufnahmeraten bestimmen, da BrdU selbst 24 h nach der Inkorporation auf die Zellen mutagen wirkt. Hier wurden daher das Wachstum der Population über die Erstellung von Wachstumskurven in NIH/3T3 Fibroblasten untersucht (siehe Abbildung 22).

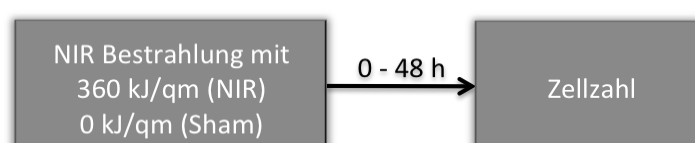


Abbildung 22: Experimenteller Ablauf zur Bestimmung der Wachstumskurven nach NIR Exposition

Zunächst wächst die Sham-Kontrolle in den ersten 24 h deutlich schneller als die NIR-bestrahlten Zellen. Circa 30 h nach Bestrahlung kehrt sich das Verhältnis um, und die Verdopplung der mit 360 kJ/qm NIR bestrahlten Zellen liegt deutlich über der Sham-Kontrolle (Abbildung 23).

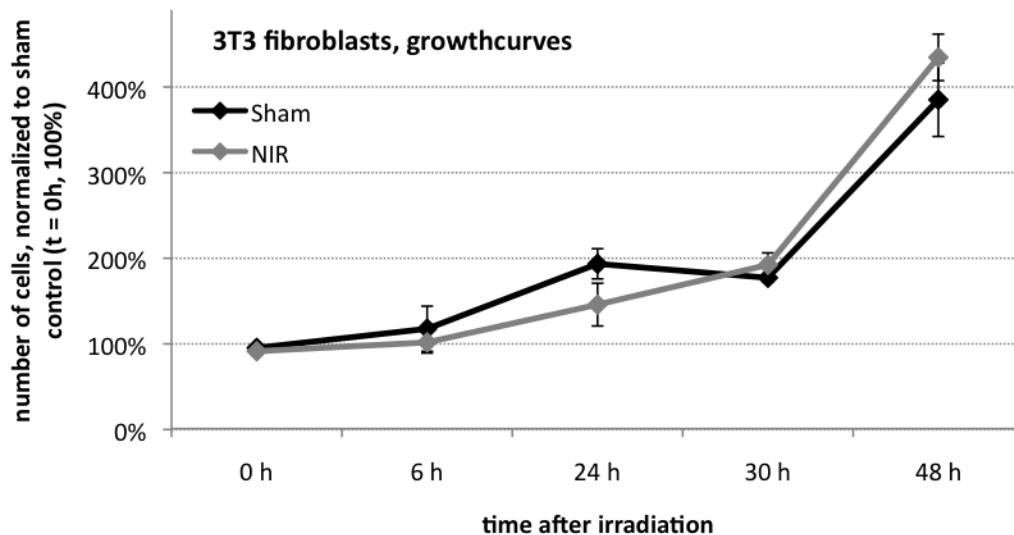


Abbildung 23: Bestrahlung mit nahem Infrarot führt zu einer Erhöhung der Verdopplungszeit in den ersten 24 h. Eine initiale Bestrahlung von NIH/3T3 Fibroblasten mit 360 kJ/qm NIR führt in den ersten 24 h zu einer Verlängerung der Generationszeit im Vergleich zur Sham-Kontrolle. Ab ca. 30 h kehrt sich dieses Phänomen um, und die NIR-bestrahlten Kulturen verdoppeln sich deutlich schneller als die parallel untersuchte Sham-Kontrolle. Die Daten stellen den Mittelwert aus mehreren unabhängigen Versuchen in Triplikaten ($n=3$) \pm SE dar.

3.4.4 Proliferation über BrdU-Aufnahmeraten

Ionisierende Strahlung kann den Zellzyklus und damit einhergehend die Proliferation negativ beeinflussen. Zur Untersuchung des Einflusses von Röntgenstrahlung in Kombination mit NIR auf die Proliferation wurde diese über BrdU-Aufnahmeraten über 24 h nach der Röntgenbestrahlung bestimmt (siehe Abbildung 24).

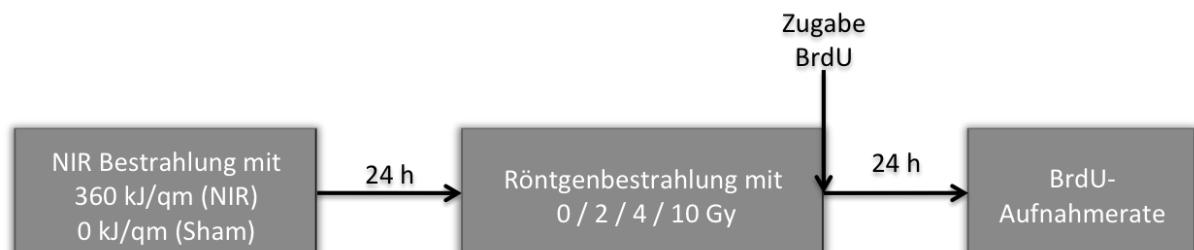


Abbildung 24: Experimenteller Ablauf zur Bestimmung der BrdU-Aufnahmeraten nach Röntgen

Sowohl in Fibroblasten als auch in retinalen Vorläuferzellen reduziert sich die BrdU-Aufnahmerate mit steigender Röntgendosis in nicht vorbehandelten Zellen. Bei einer Dosis von 10 Gy wird diese in Fibroblasten annähernd halbiert und in R28 Zellen um ein Drittel verringert. Im Vergleich zur Sham-Kontrolle verursacht die reine NIR-Bestrahlung einen ebenfalls signifikanten Abfall der BrdU-Aufnahmerate (Abbildung 25a, 0 Gy). Bemerkenswerterweise bewirkte eine NIR-Vorbehandlung, gefolgt von einer Röntgenexposition einen gegenteiligen Effekt. Die Reduktion der BrdU-Aufnahme, die durch Röntgen induziert wird, wird teilweise aufgehoben, bis sogar im Fall der 4 Gy Bestrahlung in R28 Zellen durch die NIR-Vorbehandlung nahezu das Kontrollniveau erreicht ist. Dies ist bereits ab 4 Gy hochsignifikant in R28 Vorläuferzellen (Abbildung 25b) und ab 10 Gy in Fibroblasten (Abbildung 25a) nachweisbar.

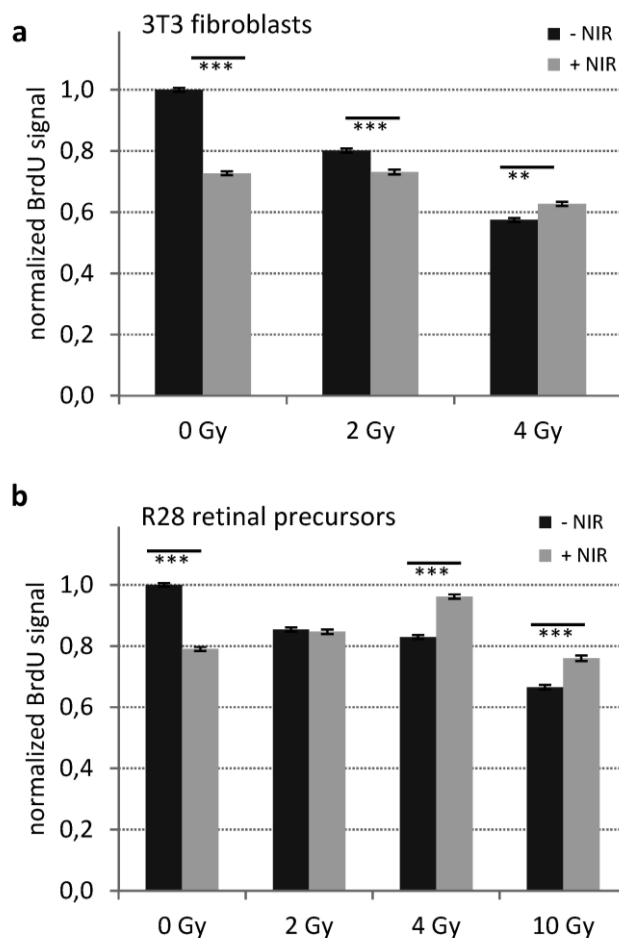


Abbildung 25: NIR Bestrahlung mit 360 kJ/qm wirkt der proliferationshemmenden Wirkung von Röntgenbestrahlung entgegen.

Die Zellproliferation wurde über BrdU-Aufnahme in den ersten 24 h nach Röntgenexposition bestimmt. NIR-Bestrahlung mit 360 kJ/qm bewirkt in beiden Zelllinien eine signifikante Reduktion der BrdU-Aufnahmeraten. Ebenso sinkt diese mit steigender Röntgendosis zunehmend (schwarz). In Kombination von NIR mit Röntgenexposition ist die BrdU-Aufnahmerate im Vergleich zu ausschließlich Röntgen-bestrahlten Zellen sowohl in Fibroblasten (a, 10 Gy) als auch in R28 Zellen (b, ab 4 Gy) signifikant erhöht. Die Daten stellen die normalisierten Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten dar ($n=3$) \pm SE. Die Statistische Analyse erfolgte mittels *two-tailed students t-test* (CI=95%, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$).

Da im Zeitraum von 24-48 h nach NIR-Bestrahlung die BrdU-Aufnahmerate in beiden Zelllinien signifikant gesunken war, wurde überprüft, ob dieser Effekt auch bei anderen NIR-

Dosen auftrat. Dazu wurden R28 Zellen mit Dosen von 0 – 720 kJ/qm NIR bestrahlt und die BrdU-Aufnahmeraten im Zeitraum von 24-48 h nach NIR bestimmt (siehe Abbildung 26).

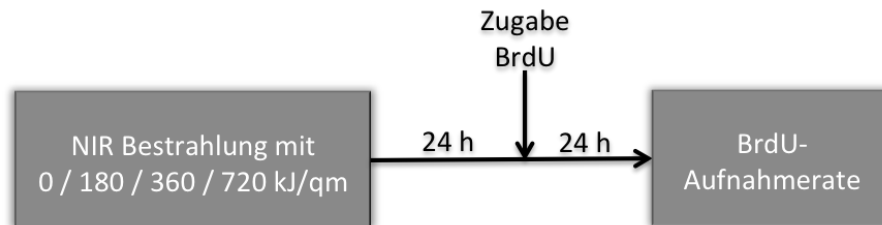


Abbildung 26: Experimenteller Ablauf zur Bestimmung der BrdU-Aufnahmeraten nach NIR

Es zeigt sich eine Dosis-Wirkungsbeziehung in Form einer Abnahme der Proliferation mit steigender Dosis im untersuchten Zeitraum (Abbildung 27).

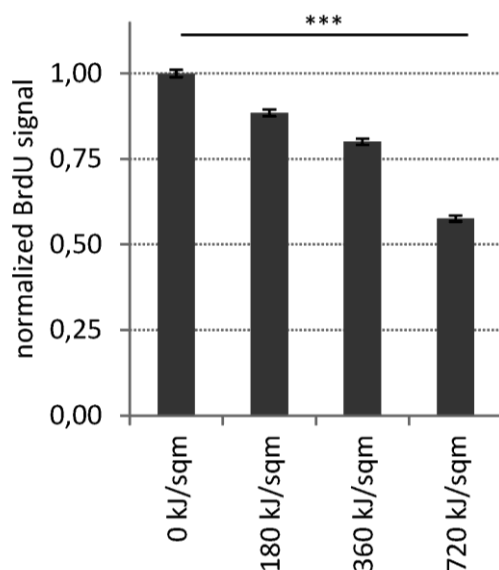


Abbildung 27: Bestrahlung mit naher Infrarotstrahlung bewirkt eine dosisabhängige Hemmung der Proliferation in R28 retinalen Vorläuferzellen. Die Proliferation wurde über die BrdU-Aufnahmerate im Zeitraum von 24-48 h nach Bestrahlung mit 0, 180, 360 und 720 kJ/qm bestimmt. Die Daten stellen die normalisierten Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten dar ($n=2$) \pm SE. Die Statistische Analyse erfolgte mittels *One-Way ANOVA* (CI=95%, *** $P<0.001$).

3.5 DNA Schädigung und Reparatur

Ionisierende Strahlung verursacht schwerwiegende Schäden in bestrahlten Zellen und Geweben, einschließlich der Induktion von DNA Doppelstrangbrüchen (DSBs) und damit einhergehender Aktivierung von Zellzykluscheckpunkten. Ein idealer Marker für die Quantifizierung und Analyse der Reparaturkapazität von DNA-DSBs ist das phosphorylierte H2AX Histon (γ H2AX).

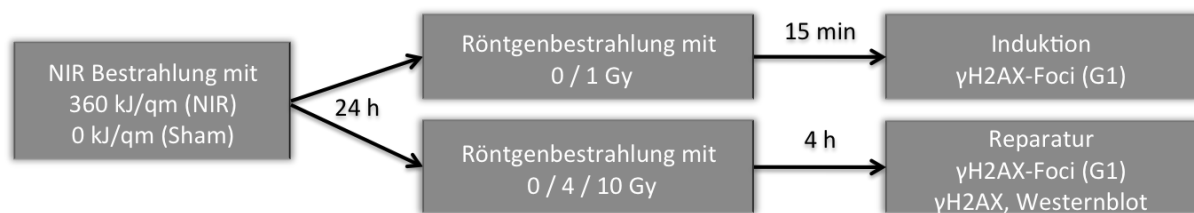


Abbildung 28: Experimenteller Ablauf zur Bestimmung der Induktion und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen anhand der Phosphorylierung des Histons H2AX

Zunächst wurde in Fibroblasten die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen anhand der Anzahl an γ H2AX-Foci in G1-Phase-Zellen 15 min nach 1 Gy Röntgenexposition (Abbildung 29a) bestimmt. Eine geringe Anzahl an spontanen Foci ist in der Sham-Kontrolle wie auch in NIR-bestrahlten Zellen nachweisbar (Abbildung 29a, 0 Gy). In den Röntgen bestrahlten Zellen ist die Anzahl der γ H2AX-Foci deutlich erhöht, jedoch sind keine signifikanten Veränderungen zwischen Röntgenbestrahlten Zellen und kombiniert bestrahlten Zellen feststellbar.

Die Reparaturkapazität der Zellen wurden anschließend 4 h nach 4 Gy Röntgenexposition, sowohl mit als auch ohne NIR-Vorbehandlung bestimmt. Auch zu diesem Zeitpunkt ist eine geringe Anzahl an spontanen Foci in der Sham-Kontrolle wie auch in NIR-bestrahlten Zellen nachweisbar (Abbildung 29b, 0 Gy). Bemerkenswerterweise ist die Anzahl der verbleibenden γ H2AX-Foci in den G1-Zellen nach Kombination mit einer NIR-Vorbehandlung signifikant höher (Abbildung 29b, 4 Gy). Angesichts der gleichen Induktionszahlen an DNA-DSBs spricht diese höhere Zahl an verbleibenden Foci für eine Reparaturdefizienz.

Zusätzlich wurde die DNA-Reparatur in 3T3 Fibroblasten 4 h nach Exposition gegenüber 10 Gy Röntgen in γ H2AX-Westernblotanalysen in der gesamten Zellpopulation untersucht (Abbildung 29c). Lediglich ein schwaches Hintergrundsignal an γ H2AX-Protein kann für Sham-Kontrollen und NIR-bestrahlte Zellen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu ist eine signifikant erhöhte Phosphorylierung von H2AX in Röntgen-bestrahlten Zellen vorhanden. Die Vorbehandlung mit 360 kJ/qm NIR resultiert auch in der Gesamtpopulation in einer

signifikanten Erhöhung der Phosphorylierung im Vergleich zu reiner Röntgenbestrahlung. Diese Beobachtung lässt sich durch eine bildanalytische Auswertung der Banden aus drei unabhängigen Versuchen quantifizieren (Abbildung 29d).

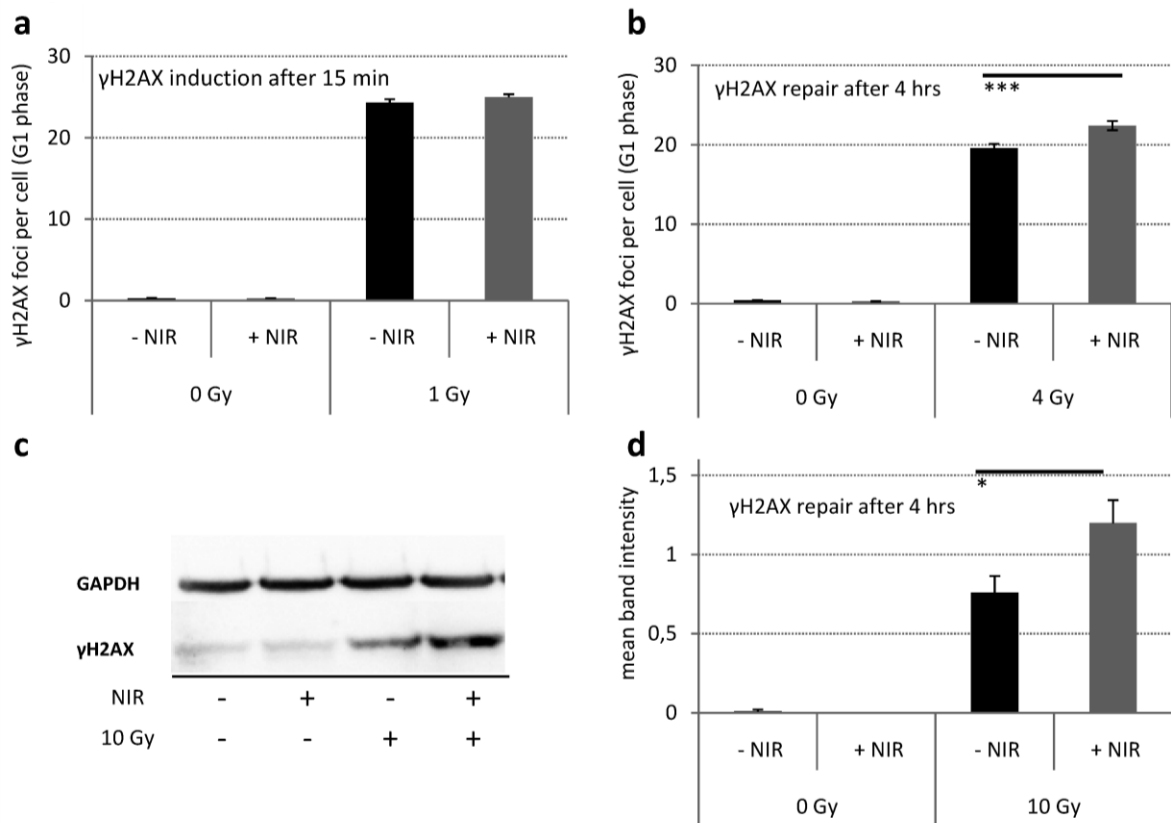


Abbildung 29: NIR-Vorbehandlung bewirkt eine erhöhte Persistenz von röntgeninduzierten DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB). Während die NIR-Vorbehandlung keinen Einfluss auf die Induktion von DNA-DSBs, bestimmt über die Rate an γ H2AX-Foci in G1-Zellen, 15 min nach 1 Gy Röntgenexposition (a) nimmt, verbleiben jedoch signifikant mehr γ H2AX-Foci 4 h nach 4 Gy unrepariert (b). Die NIR-Bestrahlung allein nimmt dabei keinen Einfluss auf die Spontanrate an γ H2AX-markierten DNA-DSBs in G1-Phase Zellen. (c) Westernblotanalysen nach 10 Gy Röntgenbestrahlung zeigen ein signifikant höheres γ H2AX-Signal der Gesamtpopulation nach NIR-Vorbehandlung im Vergleich zur reinen Röntgenbestrahlung. Wiederum hat die NIR-Bestrahlung allein keinen Einfluss auf das γ H2AX-Signal. GAPDH wurde hier als Kontrollprotein bestimmt. (d) Die Quantifizierung der Westernblot-Banden aus 3 unabhängigen Experimenten zeigt, dass die Erhöhung des γ H2AX-Signals signifikant ist. Die Daten stellen die Mittelwerte aus unabhängigen Experimenten ($n=3$) \pm SE dar. Die Statistische Analyse erfolgte mittels *twotailed students t-test* (CI=95%, * $P<0.05$, *** $P<0.001$).

In der Westernblotanalyse von γ H2AX (Abbildung 30) 24 h nach 10 Gy Röntgen, sind keine unreparierten Doppelstrangbrüche über γ H2AX mehr nachweisbar.

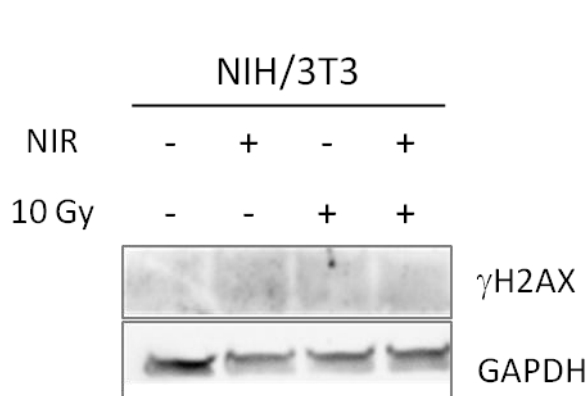


Abbildung 30: 24 h nach Röntgenexposition phosphoryliertes H2AX ist in der Westernblotanalyse der Gesamtpopulation, 24 h nach Röntgen, ist γ H2AX in keiner der untersuchten Zellenpopulationen, mehr nachweisbar. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment; dieser Nachweis wurde für 3 unabhängige Versuche erbracht. GAPDH wurde hier als Kontrollprotein bestimmt.

3.6 Induktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind in der Lage über sekundäre Mechanismen sowohl die DNA zu schädigen, als auch die DNA Reparatur zu beeinflussen (34-35). Zur Bestimmung endogener ROS Level wurden daher FACS Analysen einer Färbung mit 2',7'-Dichlorofluorescein diacetat (DCFDA) in 3T3 Fibroblasten nach Exposition von 10 Gy Röntgen, sowohl mit als auch ohne NIR-Vorbehandlung durchgeführt (siehe Abbildung 31).

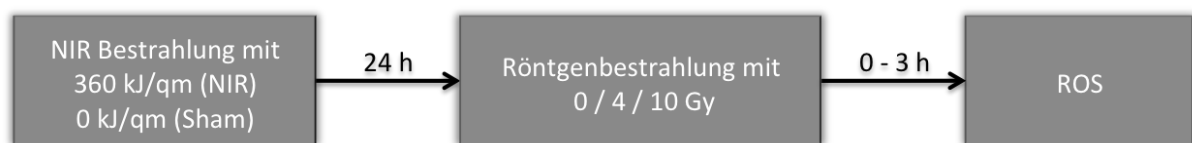


Abbildung 31: Experimenteller Ablauf zur Bestimmung der Induktion reaktiver Sauerstoffspezies

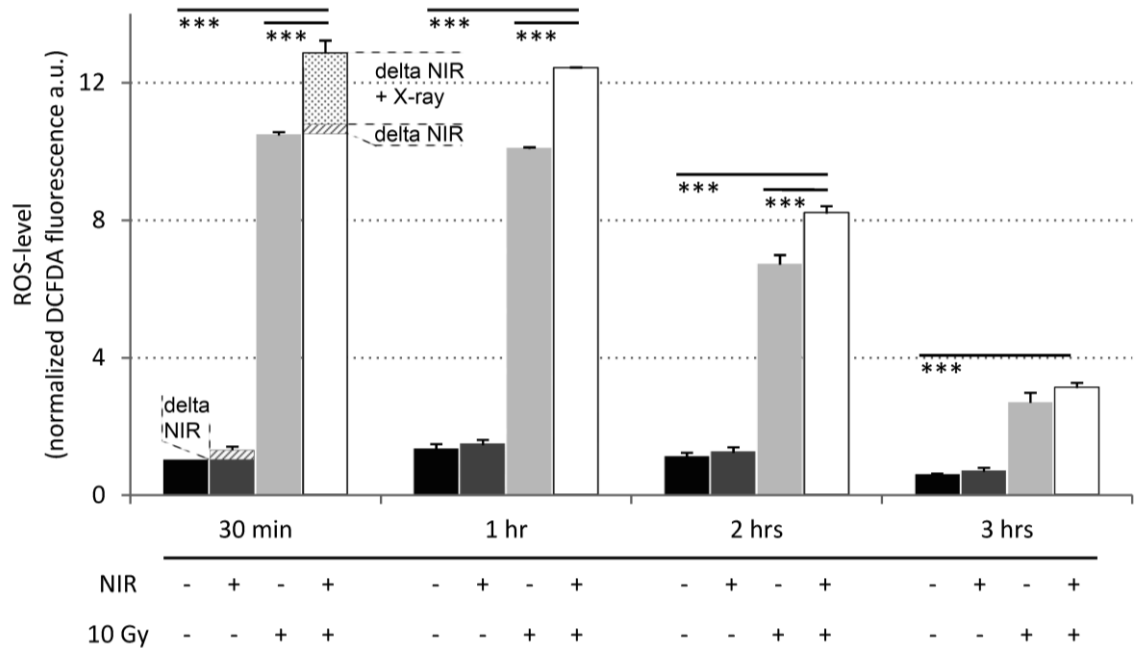


Abbildung 32: Vorbehandlung mit NIR zeigt einen mehr als additiven Effekt auf den Level endogener reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) nach Röntgenexposition. Über DCFDA-Fluoreszenz in FACS-Analysen bestimmte ROS-Level in 3T3 Fibroblasten zeigen in NIR behandelten Zellen (dunkelgrau) einen leichten, aber nicht signifikant höheren ROS-Level (delta NIR, diagonal gestreift) als die unbehandelten Kontrollen (schwarz). Die Bestrahlung der Kontrollen mit 10 Gy Röntgen bewirkt einen signifikanten Anstieg des ROS Levels (hellgrau), wogegen NIR vorbehandelte Zellen einen deutlich höheren ROS-Level aufwiesen. Dieser Effekt ist deutlich höher als ein reiner additiver Effekt von NIR und Röntgen wäre (gepunkteter Kasten), und bleibt bis zu 3 h nach Bestrahlung bestehen. Die Daten stellen die normalisierten Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten dar ($n=3$) \pm SE. Die Statistische Analyse erfolgte mittels *One-Way Anova in Kombination mit Tukey-Test* (CI=95%, *** $P<0.001$).

Bereits die Vorbehandlung mit NIR allein bewirkt eine leichte, aber nicht signifikante Erhöhung des endogenen ROS Levels (Abbildung 32, delta NIR). Durch Bestrahlung der Kontrollzellen mit 10 Gy Röntgen wird eine hochsignifikante Erhöhung des ROS Levels induziert. Die Bestrahlung der NIR vorbehandelten Zellen zeigt ein nochmals deutlich höheres ROS-Level. Diese signifikante Erhöhung übersteigt einen additiven Effekt der NIR- und Röntgenbestrahlung um ein Vielfaches (Abbildung 32, delta NIR+X-ray). Im Verlauf der nachfolgenden Stunden wird das ROS-Level langsam wieder in Richtung des Kontrollniveaus reduziert. Die Erhöhung in den kombiniert bestrahlten Zellen verbleibt jedoch bis zu 3 h nach der Röntgenexposition.

Zur Feststellung direkter Interaktion der generierten ROS mit der DNA wurden in R28 Vorläuferzellen 4 h nach einer Röntgenexposition die Bildung von 8-oxo-dG (8-oxo-7,8-

dihydro-2'-deoxyguanosine) DNA-Addukten immunhistochemisch nachgewiesen (siehe Abbildung 33).

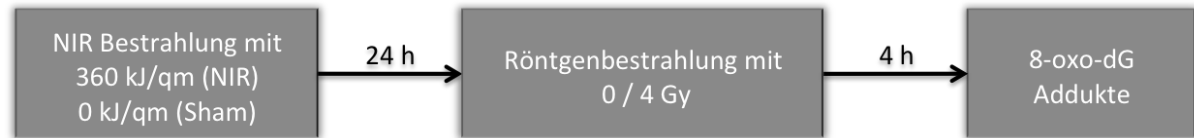


Abbildung 33: Experimenteller Ablauf zur Bestimmung der Generierung von ROS-induzierten 8-oxo-dG Addukten

Ein signifikant höheres Level an 8-oxo-dG ist schon in NIR-behandelten Zellen im Vergleich zur Sham-Kontrolle nachweisbar (Abbildung 34). Dieses Level ist zusätzlich erhöht in Röntgen-bestrahlten Proben und wird noch übertroffen durch eine NIR-Vorbehandlung.

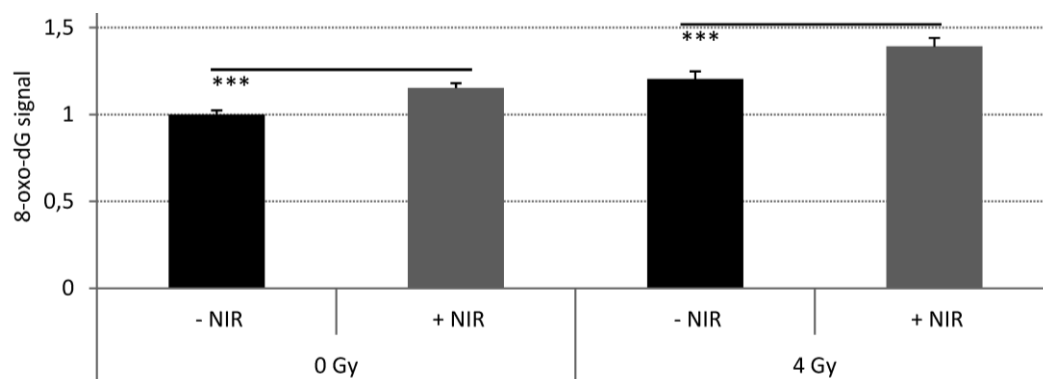


Abbildung 34: Bestrahlung mit nahem Infrarot induziert vermehrt 8-oxo-dG-Addukte in R28 Zellen und bewirkt zudem eine Erhöhung der röntgeninduzierten Schäden. In R28 Vorläuferzellen ist eine Erhöhung von 8-oxo-dG-Addukten nach NIR-Behandlung (grau, links) im Vergleich zur Sham-Kontrolle (schwarz, links) nachweisbar. Röntgenbestrahlung (schwarz, rechts) führt nach 4 h zu einer deutlichen Erhöhung, die in Kombination mit einer NIR-Vorbehandlung noch gesteigert wird (grau, rechts). Die Daten stellen die normalisierten Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten dar ($n=3$) \pm SE. Die Statistische Analyse erfolgte mittels *One-Way Anova in Kombination mit Tukey-Test* (CI=95%, *** $P<0.001$)

3.7 Mitochondriale Masse

Der Status des mitochondrialen Membranpotentials sowie eine Zunahme der mitochondrialen Masse kann direkt Einfluss auf das endogene ROS-Level haben. Um zu klären, ob dies möglicherweise der Fall und damit Ursache für die erhöhten ROS-Level in NIR bestrahlten Zellen ist, wurde die Veränderung der mitochondrialen Masse über Interkalation von *Mitotracker green* in die Lipidmembran der Mitochondrien in FACS-Analysen bestimmt (siehe Abbildung 35).

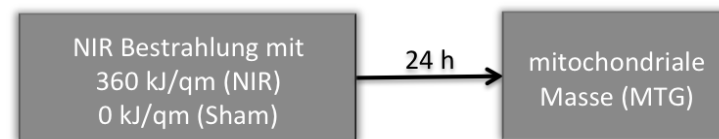


Abbildung 35: Experimenteller Ablauf zur Bestimmung der mitochondrialen Masse

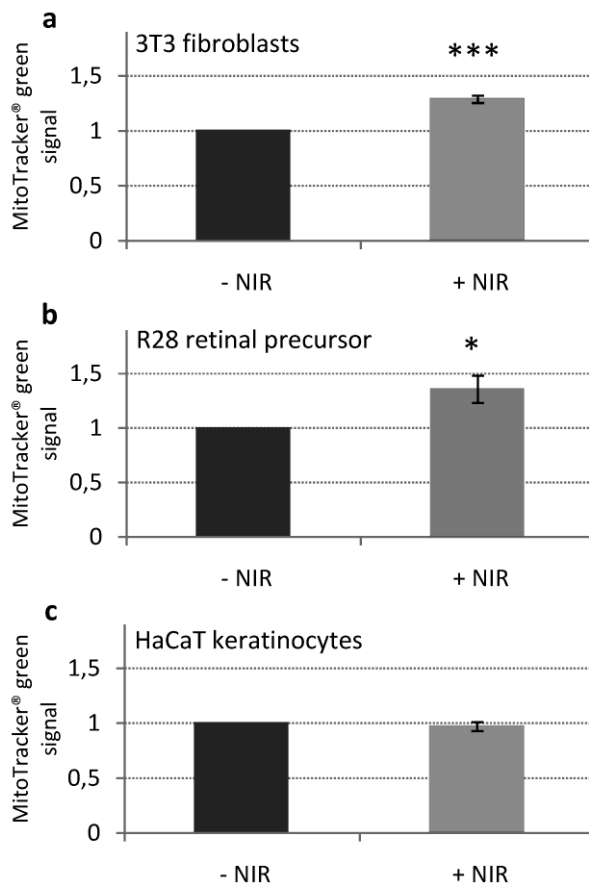


Abbildung 36: Bestrahlung mit nahem Infrarot erhöht die mitochondriale Masse sowohl in R28 retinalen Vorläuferzellen, als auch in 3T3 Fibroblasten. Die über *Mitotracker green*-Fluoreszenz in FACS-Analysen bestimmte mitochondriale Masse in R28 Vorläuferzellen (a) sowie in 3T3 Fibroblasten (b) ist 24 h nach der Exposition mit NIR signifikant erhöht. In humanen HaCaT Keratinozyten (c) ist keine signifikante Veränderung der mitochondrialen Masse nachweisbar. Die Daten stellen die normalisierten Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten dar (3T3: n=4, R28, HaCaT: n=3) \pm SE. Die Statistische Analyse erfolgte mittels *students t-test* (CI=95%, *P<0.5, *** P<0.001).

Es zeigt sich 24 h nach der Einwirkung von NIR eine signifikante Erhöhung der mitochondrialen Masse sowohl in R28 Vorläuferzellen (Abbildung 36a), als auch in 3T3 Fibroblasten (Abbildung 36b). Es lässt sich jedoch keine signifikante Erhöhung in HaCaT Keratinozyten (Abbildung 36c) nachweisen.

3.8 Westernblotanalysen möglicher Interaktionspartner der durch NIR potentiell beeinflussten Signalkaskaden

3.8.1 Expression und Aktivierung von p53

Die Aktivierung p53-abhängiger Signalkaskaden kann über mehrerlei Wege geschehen. Zum Einen beruht die Regulation auf der veränderten Expression, oder aber einer Stabilisierung des Proteins. Zum Anderen kann die Regulation der Signale über die Aktivierung von p53, z.B. durch Phosphorylierung erfolgen.

Es wurde daher sowohl die Expression von p53 als auch dessen potentielle Aktivierung über die Phosphorylierung am Serin 15 im Westernblot, 4 h nach der Röntgenbestrahlung untersucht (siehe Abbildung 37).

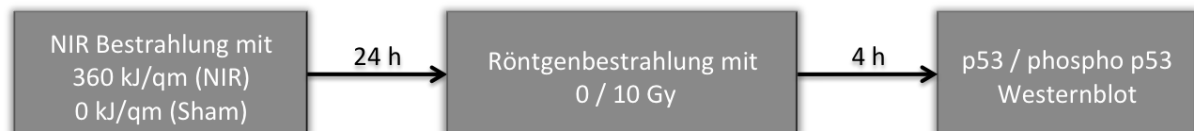


Abbildung 37: Experimenteller Ablauf zur Bestimmung des Expressionslevels, sowie der Aktivierung von p53

Um beide Varianten gleichzeitig darstellen zu können, wurde auf das Strippen der Membran nach der Detektion von p53 verzichtet und eine zweite Inkubation mit dem Antikörper gegen das am Serin 15 phosphorylierte p53 nachfolgend durchgeführt (Abbildung 38).

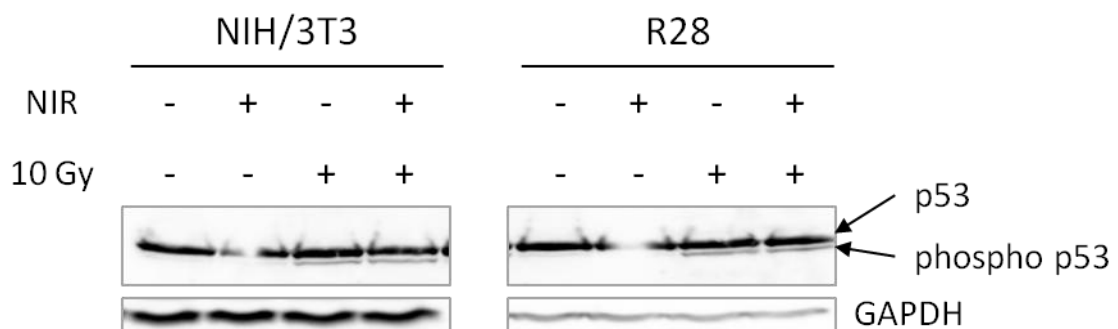


Abbildung 38: NIR zeigt weder einen Einfluss auf die Expression noch auf die röntgeninduzierte Aktivierung von p53. Die Westernblotanalyse von p53 zeigt in keiner der Zelllinien (NIH/3T3 Fibroblasten, links; R28 retinale Vorläuferzellen, rechts) eine Veränderung, weder durch NIR, noch durch Röntgen oder die Kombination beider Strahlenarten. Die Aktivierung von p53 durch Phosphorylierung am Serin 15 kann in beiden Zelllinien durch die Röntgenbestrahlung mit 10 Gy induziert werden. Es zeigt sich jedoch kein zusätzlicher Einfluss auf pp53(ser15) durch eine NIR-Vorbehandlung. GAPDH wurde hier als Kontrollprotein bestimmt. Die Blots zeigen jeweils ein repräsentatives Ergebnis von 3 unabhängigen Versuchen.

Es zeigte sich keine veränderte Expression oder Stabilisierung von p53, weder in NIH/3T3 Fibroblasten, noch in R28 Vorläuferzellen. Die Phosphorylierung von p53 konnte in beiden Zelllinien für die Röntgenbestrahlten Proben nachgewiesen werden, jedoch zeigte sich keine Veränderung durch die Vorbehandlung mit NIR.

3.8.2 Expression der *never-in-mitosis-A (NIMA)-related* Kinase Nek1

Nek1 ist ein Protein, welches eine Rolle bei der Spindelorganisation, bei der Zellzyklusregulation, insbesondere für den Eintritt und die Progression durch die Mitose und bei der DNA-Schadenserkennung spielt. Eine Veränderung des endogenen Nek1-Levels nimmt somit direkt Einfluss auf diese regulatorischen Mechanismen. Gerade deren Funktionalität scheint wiederum bei der Entstehung mitotischer Katastrophen von großer Bedeutung zu sein. Eine veränderte Expression von Nek1 könnte deshalb eine Rolle bei der veränderten Schadensantwort von NIR vorbehandelten Zellen nach der Röntgenexposition spielen. Es wurden daher die endogenen Nek1-Level zum Zeitpunkt der Röntgenstrahlung bestimmt. Dazu wurden NIH/3T3 Fibroblasten mit Dosen von 180, 360 und 720 kJ/qm nahem Infrarot, sowie einer Sham-Kontrolle bestrahlt und das Expressionslevel von Nek1 24 h nach NIR-Bestrahlung im Westernblot bestimmt (siehe Abbildung 39).

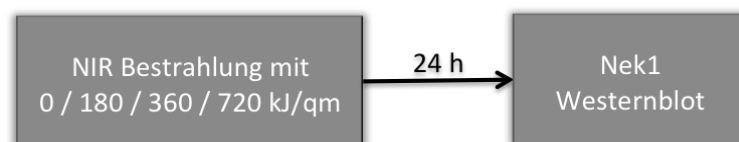


Abbildung 39: Experimenteller Ablauf zur Bestimmung des Expressionslevels von Nek1 nach NIR

Es zeigt sich bereits ab einer Dosis von 180 kJ/qm NIR eine leicht erhöhte Expression von Nek1. Bei den höheren NIR Dosen von 360 und 720 kJ/qm konnte eine deutliche Erhöhung der Expression nachgewiesen werden (Abbildung 40).

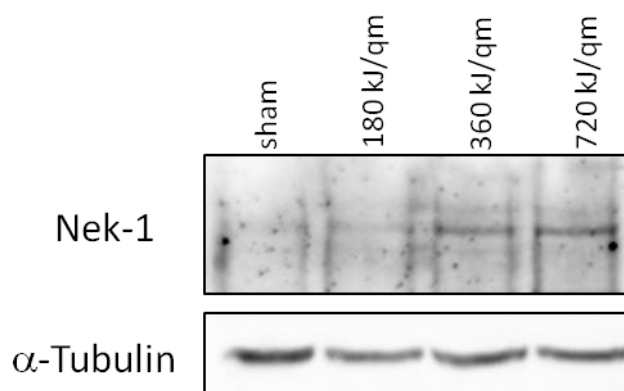


Abbildung 40: NIR induziert eine erhöhte Expression von Nek1 in Fibroblasten. Die Westernblot-analyse der Nek1 Expression 24 h nach verschiedenen Dosen mit nahem Infrarot (sham, 180, 360 und 720 kJ/qm) zeigt eine erhöhte Expression für alle NIR Dosen. α-Tubulin wurde hier als Kontrollprotein bestimmt. Die Blots zeigen jeweils ein repräsentatives Ergebnis von 2 unabhängigen Versuchen.

3.8.3 Aktivierung der MAPKinase (Erk1/2)

Da in der Literatur bereits ein Zusammenhang zwischen oxidativem Stress, der Regulation der MAPKinase und der Entstehung multinukleärer Zellen gezeigt werden konnte [135], sollte untersucht werden inwieweit die Aktivierung der MAPKinase über die Phosphorylierung von Erk1/2 durch NIR und Röntgen, sowie der Kombination beider beeinflusst ist (siehe Abbildung 41).

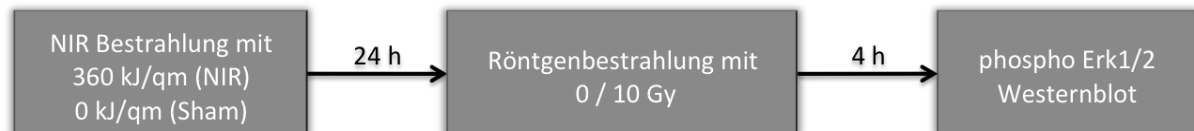


Abbildung 41: Experimenteller Ablauf zur Bestimmung der Aktivierung der MAPKinase durch Phosphorylierung von Erk1 und Erk2.

Die durchgeführten Westernblotanalysen in NIH/3T3 und R28 Zellen zeigen keinerlei Regulation der Phosphorylierung von Erk1/2 4 h nach der Röntgenbestrahlung (Abbildung 42). In der R28 retinalen Vorläuferzelllinie zeigt, sich, dass in diesen neuronalen Zellen generell eine höhere Phosphorylierung von Erk1/2 und damit vermutlich auch eine höhere Aktivität dieser Signalkaskade vorliegt.

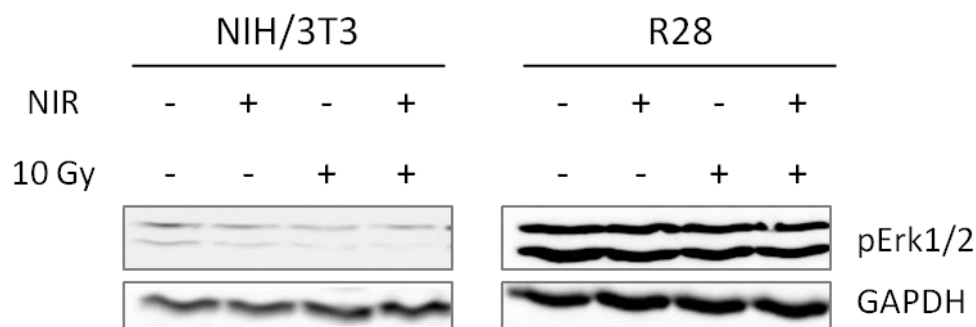


Abbildung 42: NIR hat keinen Einfluss auf die Aktivierung der MAPKinase (pErk1/2) 4 h nach Röntgenexposition. Westernblotanalysen der aktivierten MAPKinase, phospho Erk1/2, zeigen in keiner der untersuchten Zelllinie eine Veränderung durch NIR-Bestrahlung, Röntgenbestrahlung oder der Kombination aus beiden. In R28 liegt generell mehr aktivierte MAPKinase vor. GAPDH wurde hier als Kontrollprotein bestimmt. Die Blots zeigen jeweils ein repräsentatives Ergebnis von 3 unabhängigen Versuchen.

Da nach der Röntgenbestrahlung keine Regulation nachgewiesen werden konnte, wurde überprüft, ob direkt nach NIR eine Aktivierung der MAPKinase erfolgte. Dazu wurden Fibroblasten NIR und Sham bestrahlt und nach anschließendem Mediumwechsel zu

definierten Zeitpunkten geerntet. Analog dazu wurden Zellen als Induktionskontrolle mit H_2O_2 behandelt und parallel analysiert (siehe Abbildung 43).

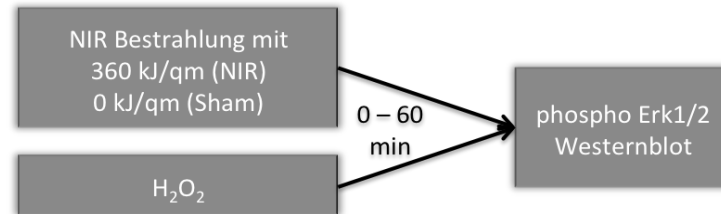


Abbildung 43: Experimenteller Ablauf zur Bestimmung der Aktivierung der MAPKinase durch Phosphorylierung von Erk1 und Erk2, direkt nach NIR bzw. H_2O_2 .

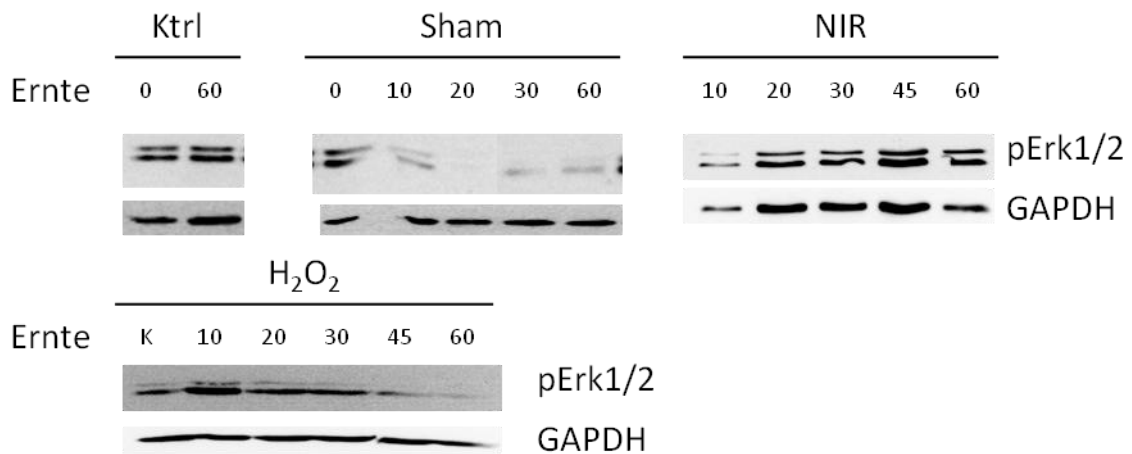


Abbildung 44: Bestrahlung mit NIR zeigt eine längere Aktivierung der MAPKinase (pErk1/2). NIH/3T3 Fibroblasten wurden mit NIR bzw. Sham bestrahlt und nach einem Mediumwechsel von serumfreiem Bestrahlungsmedium zu serumhaltigem Kulturmedium, zu definierten Zeitpunkten geerntet (oben). Zusätzlich wurde eine H_2O_2 -Kontrolle (0,1 mM H_2O_2 ; unten) parallel mitgeführt. Durch den Mediumswechsel zeigt sich in der Sham-Kontrolle (oben, links) eine Aktivierung der MAPKinase direkt nach dem Wechsel. Diese nimmt im folgenden Zeitverlauf wieder ab. Durch die Bestrahlung mit NIR (oben, rechts) zeigt sich 10 Minuten nach Bestrahlung ebenfalls ein vergleichbares Phosphorylierungslevel, welches jedoch im Folgenden nicht abnimmt, sondern bis zu 60 Minuten nach Bestrahlung stabil bleibt. Durch Zugaben von 0,1 mM H_2O_2 (unten) ist das endogene Level der Erk1/2 Phosphorylierung 10 Minuten nach Zugabe deutlich erhöht, nimmt jedoch über die Zeit wieder ab. Nach 60 Minuten ist nahezu keine Phosphorylierung von Erk1/2 mehr nachweisbar. GAPDH wurde hier als Kontrollprotein bestimmt.

Es zeigte sich, dass in der Sham-Kontrolle allein durch den Wechsel von serumfreiem Bestrahlungsmedium in serumhaltiges Kulturmedium eine Aktivierung der MAPKinase induziert wird. Die Menge an phosphoryliertem Erk1/2 geht jedoch kurz darauf wieder auf Kontrollniveau zurück. Die NIR bestrahlten Zellen zeigen dagegen eine Stabilisierung dieser Phosphorylierung bis zu 60 Minuten nach Bestrahlung (Abbildung 44).

In der H₂O₂-Kontrolle zeigt sich eine ROS-induzierte Aktivierung der MAPKinase 10 Minuten nach der Zugabe von 0,1 mM H₂O₂ ins Kulturmedium. Die Phosphorylierung nimmt jedoch mit der Zeit ab.

Die in beiden Versuchsreihen mitgeführten Kontrollen in serumhaltigem Kulturmedium zeigen ein gleichmäßiges Phosphorylierungslevel von Erk1/2.

3.9 RT-PCR-Analysen der *in-vivo*-Bestrahlung von Mäusen mit NIR

Es konnte in den *in vitro* Versuchen gezeigt werden, dass durch eine NIR-Vorbehandlung ein verändertes Genexpressionslevel von Nek1 zum Zeitpunkt der Röntgenstrahlung vorliegt. Um festzustellen, ob diese Veränderung auch *in vivo* induziert werden kann, wurden *in vivo* Bestrahlungen von postnatalen Mäusen durchgeführt und das Genexpressionslevel von Nek1 mittels RT-PCR Analysen überprüft. Zusätzlich wurden auch die Expressionslevel zweier weiterer, potentiell an der veränderten Schadensantwort beteiligten Gene, PAPG und PARP-1 untersucht.

Dazu wurden aus mehreren Würfen insgesamt 16 Mäuse der Postnatalstadien P4 und P5 mit 360 kJ/qm NIR bzw. Sham bestrahlt, für die nächsten 24 h wieder im Nest mit dem Muttertier gehalten und zur Analysen des bestrahlten/Sham-bestrahlten dermalen Gewebes abgetötet. Es erfolgte eine RT-PCR Analyse der, aus besagtem Gewebe gewonnen RNA, auf die Regulation der Gene Nek1, PARG sowie PARP-1.

Es zeigt sich eine deutliche Hochregulation von Nek1 im Gewebe in 7 der 8 NIR-bestrahlten Tiere im Vergleich zu den Sham exponierten Tieren. (Abbildung 45).

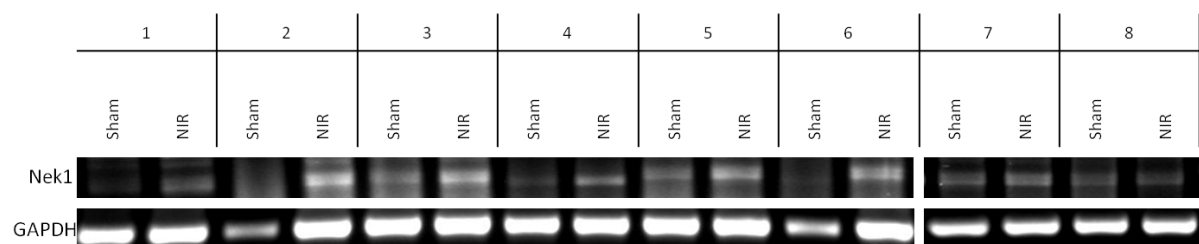


Abbildung 45: Bestrahlung mit nahem Infrarot führt zu erhöhter Expression von Nek1 in *in vivo* NIR-bestrahlten P4/P5-Mäusen. RT-PCR Analysen der mRNA für Nek1 und GAPDH als Haushaltsgen wurden für dermale Gewebe von *in vivo* bestrahlten P4/P5 Mäusen durchgeführt. Es zeigt sich eine klar erkennbare Hochregulation von Nek1 in mit 360 kJ/qm NIR bestrahlten Tieren (NIR) im Vergleich zu Sham bestrahlten Tieren. Die 16 Tiere für die gezeigten Analysen stammen aus drei Würfen, von denen jeweils die Hälfte der Tiere mit 360 kJ/qm NIR bzw. Sham bestrahlt wurde.

Auch die Expression von PARG ist 24 h nach der *in vivo* Bestrahlung mit naher Infrarotstrahlung im Vergleich zu den Sham exponierten Tieren hochreguliert (Abbildung 46).

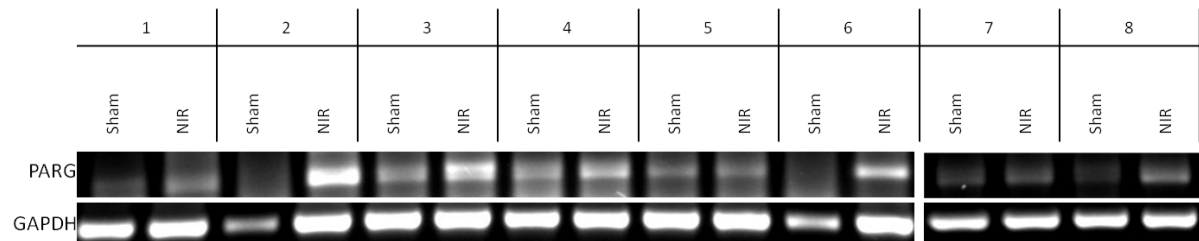


Abbildung 46: Bestrahlung mit nahem Infrarot führt zu erhöhter Expression von PARG in *in vivo* NIR-bestrahlten P4/P5-Mäusen. RT-PCR Analysen der mRNA für PARG und GAPDH als Haushaltsgen wurden für dermale Gewebe von *in vivo* bestrahlten P4/P5 Mäusen durchgeführt. Es zeigt sich eine klar erkennbare Hochregulation von PARG in 6 der 8 mit 360 kJ/qm NIR bestrahlten Tieren (NIR) im Vergleich zu Sham bestrahlten Tieren. Die 16 Tiere für die gezeigten Analysen stammen aus drei Würfen, von denen jeweils die Hälfte der Tiere mit 360 kJ/qm NIR bzw. Sham bestrahlt wurde.

Auch bei PARP-1 zeigt sich in fast allen NIR bestrahlten Tieren eine Erhöhung der Expression, wobei diese geringer als die von PARG ausfällt (Abbildung 47).

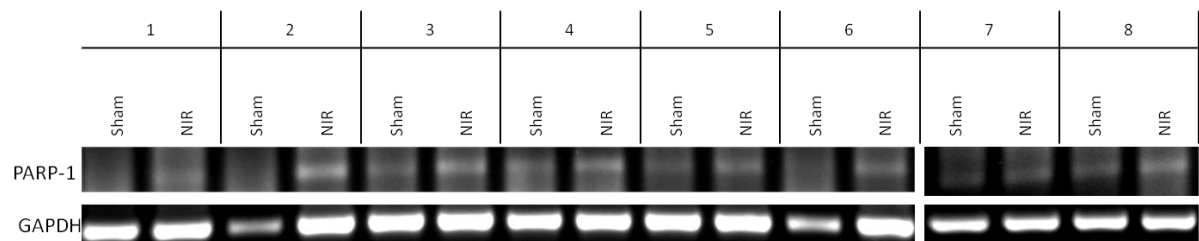


Abbildung 47: Bestrahlung mit nahem Infrarot zeigt eine tendenzielle Erhöhung der PARP-1 Expression in *in vivo* NIR-bestrahlten P4/P5-Mäusen. RT-PCR Analysen der mRNA für PARP-1 und GAPDH als Haushaltsgen wurden für dermale Gewebe von *in vivo* bestrahlten P4/P5 Mäusen durchgeführt. Es zeigt sich eine leichte erhöhte Expression von PARP-1 in mit 360 kJ/qm NIR bestrahlten Tieren (NIR) im Vergleich zu Sham bestrahlten Tieren. Die 16 Tiere für die gezeigten Analysen stammen aus drei Würfen, von denen jeweils die Hälfte der Tiere mit 360 kJ/qm NIR bzw. Sham bestrahlt wurde.

3.10 Aktivierung von *Heat Shock* Protein Expression durch NIR

Um auszuschließen, dass die veränderten Reaktionen auf Röntgenstrahlung eine durch NIR verursachte Stressantwort in Form von HeatShock-Protein Expression sind, wurden RT-PCR-Analysen für hsp70 und hsp27 24 h und 48 h nach NIR-Behandlung durchgeführt (Abbildung 48).

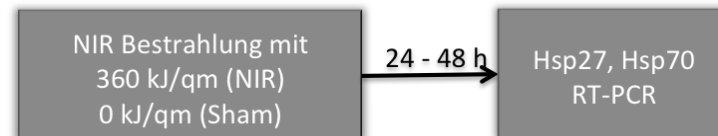


Abbildung 48: Experimenteller Ablauf zur Bestimmung der Expressionslevel von Hsp27 und Hsp70 nach NIR

Es ist keine stressinduzierte Expression der getesteten Proteine 24 h nach NIR-Bestrahlung, also zum Zeitpunkt der Röntgenexposition nachweisbar. Ebenso können nach 48 h keine erhöhten Expressionslevel festgestellt werden (Abbildung 49).

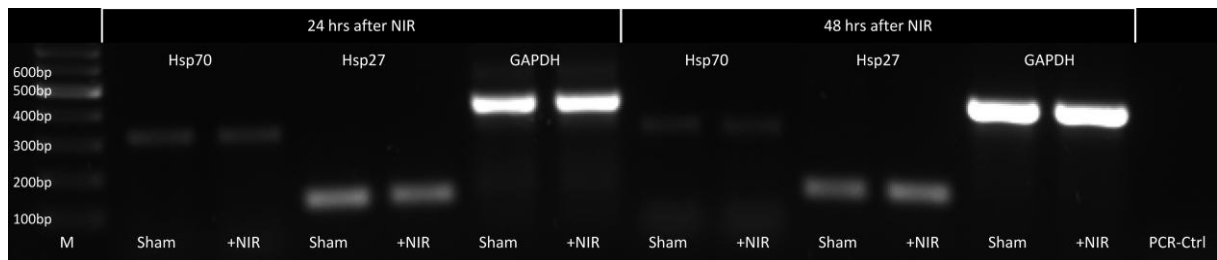


Abbildung 49: Bestrahlung mit nahem Infrarot bewirkt keine erhöhte Expression von HeatShock Proteinen. RT-PCR Analysen der mRNA für Hsp70, Hsp27 und GAPDH als Haushaltsgen wurden für NIH/3T3 Fibroblasten 24 h (links) und 48 h (rechts) nach Bestrahlung mit 360 kJ/qm NIR in Sham-Kontrollen (Sham) und NIR-bestrahlten Zellen (+NIR) durchgeführt. Es kann keine Erhöhung der Expressionslevel festgestellt werden. Die dargestellten Banden sind repräsentativ für drei unabhängige Versuche (n=3).

4 Diskussion

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob eine Vorbehandlung mit naher Infrarotstrahlung Zellen eine Protektion gegenüber röntgeninduzierten Schäden, ähnlich wie sie für UV-induzierte Schäden von Menezes und Frank et al. beschreiben wurden, verleiht [7, 11, 12].

Dazu wurde der Einfluss nicht-ionisierender, naher Infrarotstrahlung (NIR) in Kombination mit ionisierender Röntgenstrahlung auf Proliferation, DNA Schadensreparatur, sowie der Induktion mitotischer Katastrophen in drei Zelllinien unterschiedlichen Ursprungs untersucht. Weiterhin wurde die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies, die Beeinflussung der Mitochondrien sowie die Induktion früher, wie auch später apoptotischer Ereignisse untersucht.

Überraschenderweise konnte, abgesehen von apoptotischen Ereignissen, ein signifikanter Einfluss auf die Schadensantwort der Zellen auf ionisierende Strahlung, genauer gesagt auf Proliferationsraten und insbesondere auf die Entstehung mitotischer Katastrophen, durch NIR in allen Zelllinien beobachtet werden. Außerdem zeigte sich ein Einfluss auf die Entstehung endogener reaktiver Sauerstoffspezies, induziert durch ionisierende Bestrahlung. Des Weiteren konnte eine Veränderung der mitochondrialen Masse nach NIR-Bestrahlung nachgewiesen werden. Erste mechanistische Untersuchungen lassen auf eine p53-unabhängige Regulation der oben genannten Effekte schließen. Die Veränderungen könnten jedoch unter anderem mit einer veränderten Poly-ADP-Ribosylierung durch eine erhöhte Expression von PARG zusammen hängen. Zudem konnte eine veränderte Nek1-Expression nachgewiesen werden, welche möglicherweise im Zusammenhang mit der veränderten DNA-Reparatur, sowie der scheinbaren Störung der Checkpointkontrolle zusammenhängt.

Diese Daten repräsentieren hierbei die ersten Daten über, durch nicht-thermisches NIR veränderte Röntgeneffekte, sowie die ersten Daten über die Interaktion dieser beiden Strahlenqualitäten seit den 50iger Jahren des letzten Jahrhunderts überhaupt [136-141].

Die hier verwendeten Strahlendosen entsprechen bezüglich NIR einer natürlich vorkommender Infrarotexposition, welche bereits je nach Region nach einem 15-30 minütigem Aufenthalt in der Sonne erreicht wird (siehe Material und Methoden, [142]). Bezüglich der Röntgenstrahlung handelt es sich um Dosen, welche vergleichbar mit denen sind, welche während einer Strahlentherapie [132] zum Einsatz kommen. Da NIR in der Lage ist, sowohl in tiefere Hautschichten [133] ebenso wie in die Retina [134] einzudringen, wurden Zelllinien eingesetzt, deren Ursprung in diesen Gewebearten liegt. Zudem können beide Gewebearten mögliche Ziele in der Strahlentherapie darstellen; epidermale und

dermale Zellen im Fall von Hautkrebs, sowie retinale Vorläufer im Fall der Bestrahlung bei der Retinoblastomabehandlung [143, 144]. Es besteht daher die Möglichkeit, dass die analysierten Zelltypen beiden Strahlenqualitäten ausgesetzt sind, was die hier gewonnenen Daten medizinisch relevant werden lässt.

4.1 Einfluss naher Infrarotstrahlung auf die Entstehung mitotischer Katastrophen und die Induktion der Apoptose

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine kombinierte Bestrahlung mit nahem Infrarot und Röntgenstrahlen zu einer Erhöhung der röntgeninduzierten mitotischen Katastrophen (MCs) führt. Dieser Effekt konnte für zwei dermale Zelllinie, murine Fibroblasten und humane Keratinozyten, sowie für retinale Vorläuferzellen aus der Ratte nachgewiesen werden.

Da bereits bekannt war, dass Hyperthermie in der Lage ist die Rate strahleninduzierter MCs zu erhöhen [145], wurde ein experimenteller Aufbau generiert, der einer Erwärmung der Zellen bei der Infrarotbestrahlung entgegenwirkt (siehe *Material und Methoden*).

Durch den ausschließlichen Einsatz nicht-thermischer Wellenlängen des roten Lichts und nahen Infrarots für die Vorbehandlung der Zellen, war eine Induktion von *Heat Shock* Proteinen nicht zu erwarten. Dennoch würde eine potentielle Veränderung im Expressionslevel von *Heat Shock* Proteinen zum Zeitpunkt der Röntgenbestrahlung eventuell zu einer veränderten Schadensantwort der Zellen führen [118, 127]. Tatsächlich konnte aber über RT-PCR-Analysen gezeigt werden, dass keine erhöhte Expression der untersuchten *Heat Shock* Proteine HSP70 und HSP27 zum Zeitpunkt der Schadenssetzung mit Röntgen, 24 h nach NIR, vorhanden war. Eine NIR verursachte Stressantwort über *Heat Shock* Proteine konnte somit ausgeschlossen werden.

Als eine Ursache für die Entstehung mitotischer Katastrophen wird die Induktion von DNA Schäden in frühen, noch unreifen Mitosen beschrieben [146]. Ein möglicher Einfluss der NIR-Bestrahlung auf die Zellzyklusverteilung, die Anzahl der frühen Mitosen zum Zeitpunkt der Schadenssetzung durch Röntgen, könnte somit zur vermehrten Entstehung mitotischer Katastrophen führen.

Es wurden daher Zellzyklus-FACS-Analysen durchgeführt, sowie der mitotische Index 24 h nach einer NIR-Bestrahlung bestimmt. Da in beiden Analysen keinerlei Veränderungen nach NIR nachweisbar waren, kann daraus geschlossen werden, dass durch NIR keine Veränderung der Anzahl an potentiell MC-kompetenten Zellen hervorgerufen wird. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass die Behandlung mit NIR es mehr MC-kompetenten Zellen ermöglicht, trotz

DNA-Schädigung in die Mitose zu gehen und somit in eine mitotische Katastrophe zu laufen. Eine mögliche Ursache für dieses Phänomen wäre eine Beeinträchtigung der Induktion von Zellzykluscheckpoints nach Röntgenbestrahlung.

Zieht man in Betracht, dass in der Literatur das Phänomen der mitotischen Katastrophe als eine Variante des Zelltods, welche vorrangig während der Mitose auftritt, beschrieben wird [23], so bedeutet eine erhöhte Induktion an mitotischen Katastrophen sogar ein vermehrtes Abtöten der Zellen. Somit würde dies zunächst keine größere Problematik darzustellen, sondern könnte im Gegenteil sogar von Vorteil für die Tumorthherapie sein.

Allerdings konnte an Hand der AnnexinV/Propidiumiodid und TUNEL-Analyse gezeigt werden, dass es nicht zum vermehrten Eintritt des Zelltodes in den behandelten Zellen 24 h nach Röntgenbestrahlung kommt. Hinzu kommt, dass das klonogene Überleben nach der kombinierten Bestrahlung nicht verschlechtert, sondern im Einzelfall sogar erhöht war. Mitotische Katastrophen scheinen also nicht *per se* im Zelltod zu resultieren.

Neuere Publikationen von Erenpreisa und Ianzini [19] konnten über Live-Cell-Imaging sogar beobachten, dass mitotische Katastrophen, welche nicht mehr in der Lage sein sollten, eine reguläre Zellteilung durchzuführen und somit eigentlich dem Tod geweiht sind, dieses Schicksal umgehen können. So konnte beobachtet werden, dass derartige multinukleäre Zellen mit ungeschädigten Zellen fusionieren und über eine Art meiotische Chromosomenteilung mit Hilfe des Spindelapparates der „Wirtszelle“ überlebensfähige Tochterzellen mit, morphologisch von normalen Interphasekernen nicht unterscheidbaren, Zellkernen generieren. Diese sind wiederum in der Lage, weitere teilungsfähige Tochterzellen zu produzieren. Nicht nur morphologisch konnte die meiotische Neuverteilung des Erbgutes nachverfolgt werden, auch auf Genexpressionsebene zeigte sich eine Expression verschiedener meioseassoziierten Gene [147]. Das genetische Erbgut dieser, aus mitotischen Katastrophen stammenden, teilungsfähigen Tochterzellen dürfte in diesem Falle deutlich verändert sein.

Eine durch NIR induzierte Erhöhung strahleninduzierter mitotischer Katastrophen ist nun unter diesem Gesichtspunkt sehr kritisch zu betrachten. So ist im Tumorgewebe die Entstehung überlebensfähiger, genetisch entarteter Zellen wenig wünschenswert, da diese möglicherweise, wie auch bereits von Erenpreisa et al. vermutet, den Ursprung sogenannter Tumorstammzellen darstellen können [34]. Weiterhin sollte auch in Betracht gezogen werden, dass gerade die natürlicherweise NIR-exponierten normalen Zellschichten, wie die Epidermis [133], ebenso teilungsfähige adulte Stammzellen beherbergen [148]. Diese

könnten durch eine derartige Entartung ebenfalls zum Ursprung für sekundäre Tumore nach einer Strahlentherapie werden.

Deshalb wäre es von besonderer Bedeutung, die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen *in vivo* nachzuverfolgen. Ein Schritt in diese Richtung stellt die Untersuchung der kombinierten Bestrahlung von NIR und Röntgen in dreidimensionalen Gewebekulturen dar. Diese Untersuchungen wurden in der, diese Arbeit begleitenden, Diplomarbeit von A. König [1] bereits mit R28 retinalen Vorläuferzellen durchgeführt. Erwartet wurde dabei eine mögliche Umkehr von einer vermehrten Induktion mitotischer Katastrophen im 2D-System zu einer vermehrten Induktion von Apoptosen im 3D-System, wie sie von Indovina et al. für MG-63 Zellen beschrieben worden waren [149]. Jedoch zeigte sich auch in den 3D-Kulturen die Induktion mitotischer Katastrophen. Nach 4 Gy Röntgen wurde außerdem ebenfalls eine höhere Raten an MC in den NIR vorbestrahlten Proben nachgewiesen. Interessanterweise kehrt sich bei höheren Dosen dieser Effekt um, bzw. hebt sich auf. Dies geht wiederum konsistent mit den von Indovina verwendeten Dosen. Diese untersuchten die Verteilung von MCs und Apoptosen nach Dosen größer als 5 Gy. Möglicherweise zeigen Zellen in einem 3-dimensionalen Gewebeverbund eher eine Tendenz zur Generierung mitotischer Katastrophen bei niedrigeren Dosen. Was durchaus den Therapiebezug, durch vorrangigen Einsatz fraktionierter Bestrahlungen mit Dosen kleiner 5 Gy [132], relevant bleiben lässt. Inwieweit die Induktion mitotischer Katastrophen auch im *in vivo* Gewebe erfolgt, muss jedoch noch geklärt werden.

4.2 NIR beeinflusst Proliferation und DNA Reparatur in röntgenbestrahlten Zellen

Vakifahmetoglu et al. beschreiben als Ursache für die Entstehung mitotischer Katastrophen einen verfrühten Eintritt in die Mitose, trotz bestehender DNA Schäden. Somit werden diese auch durch einen unvollständigen oder gar vollständig fehlenden Zellzykluscheckpunkt verursacht [146]. Die Analyse der BrdU-Aufnahmeraten der Zellen nach den unterschiedlichen Bestrahlungen zeigen, dass nach einer einzelnen NIR- wie auch Röntgenbestrahlung innerhalb von 24 h im Vergleich zur Kontrolle weniger Zellen in die S-Phase eintreten, bzw. diese durchlaufen. Eine NIR-Vorbehandlung kehrt in kombiniert bestrahlten Proben die röntgeninduzierte Reduktion der Zellen, die in die S-Phase eintreten, um, was zu einer erhöhten Aufnahme an BrdU im Vergleich zu ausschließlich röntgenbestrahlten Proben führt. Nach Betrachtung der Wirkung der einzelnen Bestrahlungsvarianten wäre es eigentlich nicht zu erwarten gewesen, dass eine Kombination

zweier proliferationshemmender Behandlungen zu einer höheren BrdU-Aufnahmerate führt, als die ausschließliche Bestrahlung mit Röntgenstrahlung.

Obwohl diverse Studien sich mit dem Einfluss von NIR auf die Proliferation beschäftigt haben [4, 7, 12, 14, 150, 151], sind bislang keine Daten für die hier eingesetzten Dosen beschrieben. Daher verbleiben die Gründe für die beobachteten Veränderungen bezüglich der Proliferation unter NIR-Einfluss unbekannt und müssen in weiteren Studien genauer untersucht werden. Die Abnahme der Proliferation durch die Röntgenexposition ist hingegen ausführlich beschrieben und hat seine Ursache in der Induktion diverser Schäden, insbesondere von DNA Doppelstrangbrüchen (DSBs). Zur Gewährleistung der genomischen Stabilität führen solche unreparierten DNA-DSBs letztendlich zum Zellzyklusarrest und verhindern so, dass geschädigte Zellen eine maligne Transformation durchlaufen [152-156]. Wieso sich der röntgeninduzierte Zellzyklusarrest jedoch durch eine vorherige NIR-Bestrahlung beeinflussen lässt ist weiterhin unklar.

Wie zuvor bereits dargestellt wurde, ist die Zahl der DNA-Schäden, die in den Zellen vorliegen, kritisch für den Eintritt in die S-Phase [157]. Deshalb wurde der Einfluss der NIR-Bestrahlung auf die Entstehung und Reparatur röntgeninduzierter DNA-DSBs untersucht. Hierzu wurden γ H2AX-Foci in NIH/3T3 Fibroblasten in G1-Phase 15 min und 4 h nach der Bestrahlung mit 4 Gy Röntgen gezählt. Zusätzlich wurde der Level an phosphoryliertem H2AX 4 h nach 10 Gy Röntgen in der Gesamtpopulation über Westernblotanalysen bestimmt. Überraschenderweise konnten in den G1-Zellen signifikant mehr verbliebene DNA-DSBs 4 h nach dem Röntgenpuls nachgewiesen werden, wenn diese 24 h zuvor mit 360 kJ/qm NIR bestrahlt wurden. Die Westernblotanalysen von γ H2AX der Gesamtpopulation nach 10 Gy Röntgen zeigen vergleichbare Verhältnisse. Gleichzeitig konnte jedoch keine signifikante Veränderung bezüglich der Induktion von DNA-DSBs nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse weisen stark darauf hin, dass ein höheres Schadenslevel sowie eine größere Population an S-Phasezellen, möglicherweise die Voraussetzungen für die Bildung mitotischer Katastrophen, nach einer Kombination von NIR- und Röntgenstrahlung sind.

Scheinbar ist die erhöhte Zahl an DNA-DSBs nicht, oder nur zu einem geringen Teil, für die Entstehung mitotischer Katastrophen verantwortlich. Obwohl in den Langzeituntersuchungen gezeigt werden konnte, dass auch über die 24 h nach Röntgen hinaus weiterhin mitotische Katastrophen gebildet werden, sind bereits zu diesem Zeitpunkt keine DNA-DSBs über γ H2AX mehr feststellbar. Somit entstehen zumindest die späteren mitotischen Katastrophen vermutlich durch ein verlangsamtes Fortschreiten im Zellzyklus, oder aber auch durch die

weitere Teilung bereits entstandener mitotischer Katastrophen. In wie weit dies der Fall ist, könnte in nachfolgenden Untersuchungen durch Live-Cell-Imaging Analysen verfolgt werden.

4.3 Einfluss der Induktion reaktiver Sauerstoffspezies auf die DNA-Reparatur und Entstehung mitotischer Katastrophen

Reaktive Sauerstoffspezies sind nicht nur in der Lage sekundäre DNA Schäden hervorzurufen, sondern auch die DNA Reparatur selbst zu beeinflussen [158, 159]. Niedrige ROS Level, so wie sie auf Grund von Sauerstoffmangel in manchen Tumoren vorkommen, können unter anderen Tumoresistenzen triggern, in dem sie zur Aktivierung antiapoptotischer Signalwege beitragen [160]. Unter diesem Gesichtspunkt ist die Feststellung, dass eine Kombination von NIR mit Röntgenstrahlen erhöhte ROS Level sowohl in der FACS Analyse als auch in Bezug auf Bildung von 8-oxo-dG Addukten bewirkt, möglicherweise von Relevanz für eine Tumorthherapie.

Allein schon durch die Bestrahlung mit NIR konnten erhöhte Werte, sowohl für die endogenen Level an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), als auch für die generierten 8-oxo-dG Addukte nachgewiesen werden [161]. Die durch Röntgen induzierten Level überstiegen diese zwar bei weitem, jedoch bewirkte die Vorbehandlung mit NIR in den röntgenbestrahlten Proben nochmals eine signifikante Steigerung bei beiden Endpunkten.

Allerdings führte dies, wie auch an Hand der AnnexinV/Propidiumiodid Analyse gezeigt werden konnte, nicht zum vermehrten Eintritt in die Apoptose in den behandelten Zellen 24 h nach Röntgenbestrahlung. Und dies, obwohl in den kombiniert bestrahlten Zellen in zwei von drei Fällen eine Herunterregulation des antiapoptotischen Bcl2s festgestellt wurde. Diese Regulation scheint daher nicht in Zusammenhang mit der Apoptoseinduktion, sondern vielmehr mit der Induktion der mitotischen Katastrophen zu stehen. Dies geht Hand in Hand mit den auch von Castedo et al. in ihrem Review zusammengefassten Ergebnissen diverser Arbeiten [23], die zeigen, dass einige molekulare Regulationen bei mitotischen Katastrophen denen der Apoptosen gleichen.

Es bleibt jedoch zu beachten, dass abgesehen von einer potentiellen Induktion der Apoptose, reaktive Sauerstoffspezies außerdem in der Lage sind, sekundäre DNA Schäden zu induzieren [158, 159]. Da hier nachgewiesen werden konnte, dass nach einer kombinierten Behandlung von Röntgen mit nahem Infrarot die ROS Level auch 3 h nach Röntgenbestrahlung noch signifikant erhöht waren, könnten diese für die erhöhte Anzahl an γ H2AX-Foci und – möglicherweise in Kombination mit dem nachgewiesenen veränderten Proliferationsverhalten – für die höhere Anzahl an MCs verantwortlich sein.

Gerade die erhöhte Bildung der 8-oxo-dG Addukte, die bereits allein durch die Bestrahlung mit NIR induziert wird, könnte der Grund für die verlangsamte Doppelstrangbruchreparatur der Zellen nach Röntgenbestrahlung sein. Angesichts der Tatsache, dass das Verhältnis von ROS-induzierten Einzel- zu Doppelstrangbrüchen 10.000:1 beträgt [162], könnte das erhöhte ROS-Level in NIR vorbehandelten Zellen dafür sorgen, dass spezifische Reparaturproteine, welche eigentlich für Basenexcisionsreparatur (BER) und DNA Doppelstrangbruchreparatur benötigt werden, an die vermutlich vermehrt vorliegenden Einzelstrangbruchstellen rekrutiert werden. Dies hätte eine Reduktion der Reparaturkapazität der Zelle für DNA Doppelstrangbrüche sowie für das Entfernen geschädigter Basen zur Folge. Zu den möglichen Proteinen, die sowohl bei der DNA-Einzelstrangbruchreparatur, als auch bei der DNA-Doppelstrangbruchreparatur über das Nichthomologe Endjoining (NEHJ) eine Rolle spielen, gehören zum Beispiel XRCC1, PARP-1 sowie die Polynukleotidkinase (PNK) [163-167].

Es scheint jedoch nicht plausibel, dass allein das höhere Level an verbleibenden DNA-DSBs für die erhöhten Raten an mitotischen Katastrophen verantwortlich sein soll, zudem da 24 h nach der Röntgenbestrahlung keine verbliebenen DNA Doppelstrangbrüche über γ H2AX-Markierung mehr nachweisbar sind und trotzdem weiterhin mitotische Katastrophen entstehen.

Interessanterweise wurde der Zusammenhang zwischen mitotischen Katastrophen und einem ROS-induzierenden Agens in Kombination mit nicht-ionisierender Bestrahlung für den Einsatz der Photodynamischen Therapie (PDT) beschrieben. So konnte durch den Einsatz des ROS-induzierenden Photosensitizer Zn(II)-phthalocyanine (ZnPc) während der PDT ein vermehrtes Auftreten mitotischer Katastrophen festgestellt werden [168]. Diese werden anscheinend durch Veränderungen in der Konfiguration der Mitosespindel verursacht.

In beiden Fällen werden also ROS-induzierende Behandlungen (Röntgen und ZnPc) in Kombination mit Wellenlängen des roten Lichts (ca. 640 nm) bzw. nahem Infrarotlichts, beginnend im Rotlichtbereich (ca. 660 – 1.400 nm), beschrieben, welche die Entstehung von Aneuploidien und mitotischen Katastrophen zur Folge haben. Die Vermutung, dass ein direkter Bezug der induzierten ROS mit der Entstehung mitotischer Katastrophen vorliegt, geht zudem Hand in Hand mit den von Chae et al. veröffentlichten Ergebnissen zum Einfluss von H_2O_2 auf die Zellteilung. Diese zeigen, dass die Induktion von oxidativem Stress die Bildung multipolarer Spindeln und die Hyperamplifikation von Zentrosomen fördert, was schlussendlich zu der Entstehung multinukleärer und polyploider Zellen führt [135].

Somit zeigt sich, dass die Auswirkungen der ROS auf die Entstehung multinukleärer Zellen über mehrerlei Wege, der Einwirkung auf die Zellzyklusregulation, der Bildung der

mitotischen Spindel und auch der Beeinflussung der DNA-Reparatur, abläuft. Eine NIR-induzierte Veränderung des ROS-Levels, kann dadurch an mehreren Stellen die zellulären Prozesse stören.

4.4 Reaktive Sauerstoffspezies als Ursache für die gestörte Regulation des Zellzykluses

Die vorhergehend diskutierten Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine Erhöhung der genomischen Instabilität in röntgenbestrahlten Zellen durch die Vorbehandlung mit NIR, die Konsequenz einer gestörten Zellzyklusregulation, vor allem jedoch einer fehlenden Arretierung am G1/S-Checkpoint und G2/M-Checkpoint ist. Die Fehlfunktion des ersteren erlaubt den Zellen trotz vorhandener Schäden in die S-Phase einzutreten, was über BrdU-Aufnahmeraten nachgewiesen werden konnte. Letzterer ermöglicht die Zellteilung geschädigter Zellen, woraufhin vor allem die Rate an mitotischen Katastrophen hinweist.

Da bekannt ist, dass NIR einen Einfluss auf die Mitochondrien, unter anderem auf die Cytochrom C Oxidase als Bestandteil der oxidativen Phosphorylierung hat [8, 169], könnten die induzierten ROS für die Störung der mitochondrialen Signalkaskaden, die Einfluss auf die Proliferation nehmen, verantwortlich sein. Offen bleibt bislang, warum in den NIR bestrahlten Zellen mehr ROS durch Röntgenbestrahlung induziert werden können. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre eine Modifikation der Mitochondrien die vermutlich generell das primäre Target der NIR Strahlung sind [8, 169].

Analysen mittels des mitochondrienspezifischen Fluoreszenzfarbstoffs *MitoTracker Green* (MTG) zeigen zum Zeitpunkt der Röntgeninduktion einen deutlichen Einfluss auf die mitochondriale Masse sowohl in Fibroblasten als auch in retinalen Vorläuferzellen, jedoch nicht in HaCaT Keratinozyten. Da der Farbstoff *MitoTracker Green* die Mitochondrien unabhängig vom mitochondrialen Membranpotential färbt, geht die Erhöhung des Fluoreszenzsignals direkt mit einer Erhöhung der mitochondrialen Masse [170, 171] einher. Da aber auch gezeigt wurde, dass die MTG-Fluoreszenz ebenfalls durch H₂O₂ beeinflusst werden kann [172], muss auch eine mögliche Veränderung des intrazellulären Redoxstatus in Betracht gezogen werden.

Die NIR-induzierten Veränderungen des mitochondrialen Status könnten die Ursache für die höheren intrazellulären ROS-Level nach Röntgenbestrahlung sein. Diese Vermutung begründet sich vor allem auf zwei Studien, die sich mit dem Einfluss der Mitochondrien auf die genetische Stabilität beschäftigt haben. Beide zeigten eine erhöhte genetische Instabilität in Zellen mit einer erhöhten mitochondrialen Masse nach Bestrahlung [173, 174]. Diese

Erhöhung war zudem begleitet von einer Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials, was auf eine gestörte mitochondriale Funktionalität hinweist. Eine solche kann wiederum zu einem höheren Grundlevel an endogenen ROS in Zellen führen [173, 174]. Diese erhöhten ROS-Level könnten über mitochondrial-retrograde Signalwege für die Regulation der Genexpression von vorrangig proliferationsassoziierten Genen [175] verantwortlich sein [169]. Es lässt sich daher die Hypothese aufstellen, dass ein mitochondrial-retrograd gesteuertes Ungleichgewicht der bei der Regulation von Proliferation und Zellzyklus beteiligten Proteine verantwortlich dafür ist, dass die röntgeninduzierte Arretierung am G1/S-Checkpoint gestört ist. Dieses Ungleichgewicht könnte also unter anderem durch die NIR verursachte Modifikation des metabolischen Status der Zelle verursacht werden. Der dadurch induzierte proliferationsfördernde Einfluss könnte wiederum die Entstehung mitotischer Katastrophen fördern. Gestützt wird diese These auch durch neuere Publikationen, die zeigten, dass die Wahrscheinlichkeit der Entstehung einer mitotischen Katastrophe abhängig vom metabolischen Status der Zelle ist [173, 176-178].

Interessanterweise handelt es sich bei den beiden Zelllinien, die hier eine Veränderung des MTG-Signals zeigten (NIH/3T3, R28) auch um die beiden, die empfindlicher für die Induktion mitotischer Katastrophen bei niedrigen Röntgendosen waren. Im Gegenzug dazu zeigte sich keine Veränderung in den weniger empfindlichen Keratinozyten.

Da jedoch im Falle der HaCaT Keratinozyten trotz unveränderter mitochondrialer Masse nach NIR eine Steigerung der mitotischen Katastrophen nachgewiesen werden konnte, sind mit großer Sicherheit noch weitere, vom mitochondrialen Status unabhängige, Mechanismen an deren Entstehung beteiligt.

4.5 Interpretation der DNA-schadensassoziierten Ereignisse in Kontext mit den Studien aus den 50igern

Die einzigen, soweit bekannten, veröffentlichten Daten der Kombination von naher Infrarotstrahlung mit Röntgen, sowohl als Vor- als auch als Nachbehandlung, stammen alle samt aus den 50iger Jahren des 20igsten Jahrhunderts [136-140]. Als Modellorganismen dienten dabei *Drosophila* und *Tradescantia*, wobei der Focus auf chromosomalen Schäden lag. Stets wurde jedoch eine Erhöhung des röntgeninduzierten Effektes durch eine Kombination mit nahem Infrarot beobachtet. So zeigten Kaufmann et al. [136] zum Beispiel durch Infrarotvorbehandlung eine, im Vergleich zur Röntgenkontrolle, um 50% höhere Rate an chromosomaler Reorganisation in Spermatozoen von *Drosophila*. Diese scheinen jedoch nicht endgültig zu einer erhöhten Letalität zu führen, da die Rate der rezessiv tödlichen Mutationen

unverändert blieb. Yost et al. [138] zeigten in *Tradescantia* eine signifikante Erhöhung von chromosomalen Brüchen nach Röntgen durch eine direkt vorangehende Bestrahlung mit nahem Infrarot. Zudem konnte außerdem auch durch eine nachgeschaltete Infrarotbehandlung nach Röntgen eine signifikante Erhöhung von chromosomalen Austauschen nachgewiesen werden. Interessanterweise konnte jedoch für die Nachbehandlung keine Zeit-Wirkungsbeziehung, in Hinblick auf die Abnahme der Wirksamkeit mit der Zeit, festgestellt werden. Das wurde von den Autoren dahingehend interpretiert, dass das Wirkungslimit zu diesem Zeitpunkt noch nicht ausgeschöpft war. Bezüglich der Effektivität einer NIR-Nachbehandlung nach Röntgenbestrahlung in *Drosophila* zeigten sich widersprüchliche Effekte. Kaufmann und Wilson [179] konnten keinen Einfluss durch Infrarot nach der Röntgenbestrahlung feststellen, wogegen Glass et al. [140, 180] auch in *Drosophila* einen Effekt durch die Nachbehandlung beschrieben.

Eine Auflösung des Mechanismus war zu diesem Zeitpunkt keiner der Gruppen möglich, jedoch wurden mehrere Hypothesen zur möglichen Ursache für die veränderte Strahlenantwort durch Infrarotbehandlung aufgestellt, die zudem auch die in dieser Arbeit gewonnen Daten stützen.

So wurde von den Arbeitsgruppen vermutet, dass Infrarot entweder die Anzahl der primären chromosomalen Schäden beeinflusst, oder in irgendeiner Weise den Prozess der Rekombination beschleunigt, so dass eine erhöhte Zahl an Aberrationen aus der gleichen Anzahl primärer Schäden entsteht. Ebenso möglich halten die Autoren eine Mischung aus beiden. Da auch hier keine direkten DNA-Schäden durch nahes Infrarot allein festgestellt werden konnte, wurde zu diesem Zeitpunkt vermutet, dass möglicherweise sogenannte submikroskopische Läsionen induziert werden, die jedoch erst als chromosomale Aberrationen nach der zusätzlichen Bestrahlung mit Röntgen detektierbar werden. Die, im Vergleich zur ionisierenden Röntgenstrahlung jedoch niedrigen, absorbierten Energielevel machten letztere These eher unwahrscheinlich. Zudem zeigten auch die Studien aus der Arbeit von Kaufmann [179] und Swanson [181], dass die Art der induzierten Aberrationen unabhängig vom Zeitpunkt der Infrarotbehandlung war. Eine Induktion sogenannter submikroskopischer Läsionen, so argumentieren die Autoren, würde zur Folge haben, dass der Typus der Aberrationen abhängig vom Zeitpunkt der Gabe der Infrarotbehandlung sein müsste. Da dies nicht der Fall war, konnte auch der Effekt des nahen Infrarots nicht als schwächend auf diskrete Loci in den Chromosomen erachtet werden [179]. Jedoch könnte eine globale destabilisierende Wirkung auf das chromosomale Gerüst in Betracht gezogen werden, die den Threshold der Chromosomen gegenüber hoch energetischer Strahlung effizient mindert.

Leider, so argumentieren auch die Autoren dieser frühen Arbeiten, erläutert dies nur die Wirkung einer Vorbehandlung mit nahem Infrarot. Hier lassen vor allem die Arbeiten mit *Tradescantia* den möglichen Schluss zu, dass die Nachbehandlung mit nahem Infrarot eine schwächende Wirkung auf die chromosomalen Stränge ausübt, mit dem Resultat, dass die Stellen, welche vorangehend durch Röntgen geschwächt wurden, schließlich eine vollständige Trennung der Stränge, mit einhergehender erhöhter Rate an nachweisbaren Aberrationen, zur Folge haben.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass bereits in diesen frühen Arbeiten ein erhöhender Einfluss auf die Frequenz röntgeninduzierter chromosomaler Aberrationen sowohl durch Vor- als auch durch Nachbehandlung mit nahem Infrarot, feststellen ließ. Interessanterweise konnte die Nachbehandlung ohne Verlust der Effektivität bis zu 96 h heraus gezögert werden. Dass es sich bei dem Einfluss des Infrarots nicht um einen auf die Zellzyklusphase begrenzten Effekt handelte zeigte, dass die Art der Aberration zwar abhängig vom Zeitpunkt der Röntgenstrahlung in Bezug auf den Zellzyklus war, jedoch nicht abhängig vom Zeitpunkt der Infrarotbestrahlung [136, 137, 181].

Auch in der hier vorliegenden Arbeit konnte eine direkte Induktion von DNA-Schäden, spezifisch DNA-Doppelstrangbrüchen, welche zu chromosomalen Aberrationen führen können, durch Infrarot nicht nachgewiesen werden. Auch zeigte sich anhand der Induktion von gammaH2AX keine erhöhte Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen, jedoch eine verlangsamte Reparaturkinetik sowohl in G1-Zellen als auch in der Gesamtzellpopulation 4 h nach Röntgeninduktion. Chromosomale Aberrationen, die aus diesen DNA-DSB entstehen würden, und daher auch deutlich später erst detektiert werden würden, wurden in dieser Arbeit nicht untersucht. Jedoch lässt sich hier eine Verbindung zu den Arbeiten von Kaufmann, Schwanson und Yost ziehen. Möglicherweise wäre den in diesen Studien detektierten erhöhten Aberrationsraten ebenfalls eine veränderte Reparaturkinetik vorangegangen. Um diese These zu erhärten, sollten in nachfolgenden Arbeiten chromosomale Aberrationen untersucht werden.

Weiterhin denkbar wäre ein Einfluss auf die homologe Rekombination. Insbesondere, da bei den hier detektierten, vermehrt auftretenden mitotischen Katastrophen nach kombinierter Bestrahlung von nahem Infrarot und Röntgenstrahlung, eine Umgehung des G2/M-Checkpoints eine mögliche Ursache ist [1, 182]. Da gerade in der G2-Phase vorrangig homologe Rekombination zur Reparatur von DNA-DSBs zum Zuge kommt, sollte ein Einfluss auf diesen Reparaturmechanismus über Schwester-Chromatid-Austausche (SCE, *sister chromatid exchanges*) untersucht werden.

4.6 Mechanistische Untersuchungen zur Klärung des Einflusses von NIR

Die ursprüngliche Vermutung, dass die Ursache für die erhöhten Raten an mitotischen Katastrophen durch eine Vorbehandlung mit NIR in einer erhöhten Anzahl von Mitosen zum Zeitpunkt der Röntgenbestrahlung liegt [146], konnte anhand der Mitoseindizes nicht bestätigt werden. Die widersprüchliche Wirkung von NIR nach einer Kombination mit ionisierender Strahlung lässt sich somit mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine durch NIR verursachte Veränderung im Expressionslevel bestimmter Proteine oder aber der Aktivierung bzw. Inaktivierung bestimmter Signalkaskaden zurückführen: Sie haben zur Folge, dass die Reaktion der Zellen auf die Röntgenbestrahlung nicht in der gleichen Form erfolgen kann, wie es in den Kontrollzellen der Fall ist. Ein Beispiel hierfür ist die, von Frank et al. beschriebene Aktivierung antiapoptotischer Faktoren, beginnend ca. 24 h nach der Exposition mit NIR [12]. Dies ist insofern von Bedeutung, als dass in den hier durchgeführten Experimenten die Röntgenbestrahlung genau zu diesem Zeitpunkt durchgeführt wird. Somit könnte die NIR-Behandlung der Induktion proapoptotischer Signalkaskaden durch ionisierende Strahlung entgegenwirken.

Untersucht wurden ausgewählte Signalfaktoren, welche entweder im Zusammenhang mit beiden Strahlenarten beschrieben wurden, oder spezifische funktionelle Eigenschaften haben, die möglicherweise in Zusammenhang mit den beobachteten Veränderungen stehen.

4.6.1 Einfluss auf die Expression und Aktivierung von DNA-Reparatur-assoziierten Proteinen

p53 – phospho p53

Das Tumorsuppressorprotein p53 ist aufgrund seiner vielfältigen Rollen bei der Regulation zellulärer Prozesse ein vielversprechender Kandidat für die Aufklärung des hier untersuchten Mechanismus. So wurde in der Literatur gezeigt, dass intrazelluläres p53 nicht nur nach Röntgenbestrahlung [183], sondern auch nach Bestrahlung mit naher Infrarotstrahlung [11] verstärkt exprimiert wird. Für NIR wurde in normalen humanen Fibroblasten nicht nur eine Akkumulation und Stabilisierung von p53 gezeigt, sondern außerdem auch eine Stimulation der transkriptionellen Aktivität bis über 24 h nach Bestrahlung hinaus festgestellt. Wäre dies in den hier durchgeführten Experimenten ebenfalls der Fall, würde die Röntgenstrahlung auf Zellen einwirken, die bereits ein erhöhtes p53-Level im Vergleich zu nicht-NIR-behandelten Zellen aufweisen. Dies wiederum würde zu einem zusätzlich gesteigerten p53-Level durch die Röntgenbestrahlung führen. Hierin könnte möglicherweise die Ursache für eine erhöhte Rate an mitotischen Katastrophen liegen, denn *p53-Gain-of-Function* Experimente in

Mausmutanten zeigten eine Prädisposition zur abnormalen Zentrosomenamplifikation [184, 185], was wiederum korreliert mit einer gesteigerten Aneuploidierate, sowie maligner Expression in Hauttumoren [186]. Gerade das Auftreten von Aneuploidien ist eines der Hauptmerkmale für röntgeninduzierte mitotische Katastrophen [19].

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass ein erhöhtes p53-Level, verursacht durch die Bestrahlung mit NIR und Röntgen, der Grund für die erhöhte Bildung mitotischer Katastrophen in kombiniert bestrahlten Zellen sein könnte. An dieser Stelle ist es wichtig zu erwähnen, dass Tumore, die durch eine *p53-Gain-of-Function* Mutation entstehen, sehr viel aggressiver sind und zudem die Fähigkeit zur Metastasenbildung besitzen, im Gegensatz zu Tumoren, die in Mäusen mit einer *p53-Loss-of-Function* Mutation entstehen [186]. So könnte ein Zusammenhang zwischen einer höheren Anzahl mitotischer Katastrophen, möglicherweise verursacht durch Zentrosomenamplifikation assoziierte Aneuploidien, und einer derartig erhöhten Aggressivität des Tumors bestehen. Dies ist insbesondere unter dem Gesichtspunkt von Bedeutung, dass mitotische Katastrophen nicht zwangsläufig zum Tod verurteilt sind, sondern ein Teil der Population überleben und den Ursprung für überlebensfähige Nachkommen bilden kann [18-21].

Da bereits Frank et al. eine Veränderung der Expression von p53 durch Exposition mit nahem Infrarot nachgewiesen hatten [11], wurde auch hier zunächst die Expression auf Proteinebene nach NIR bzw. in Kombination mit Röntgen, 4 h nach der Röntgenexposition (respektive 28 h nach NIR), untersucht. Entgegen den Erwartungen konnte eine Veränderung der Expression zu diesem Zeitpunkt weder durch die Bestrahlung mit nahem Infrarot, noch mit Röntgen oder einer Kombination aus beiden festgestellt werden. Da zunächst vermutet wurde, dass hier möglicherweise nicht die Stabilisierung, sondern vielmehr die Aktivierung von p53 ausschlaggebend sein könnte, wurde zur detaillierteren Aufschlüsselung dieses Ergebnisses zudem die Aktivierung von p53 über die Phosphorylierung an Ser15 untersucht. Hier konnte, wie erwartet, in allen röntgenbestrahlten Proben, phosphoryliertes p53 nachgewiesen werden. Eine Veränderung durch die Vorbehandlung mit NIR ließ sich jedoch nicht feststellen. Es muss also davon ausgegangen werden, dass die hier beobachteten Veränderungen über p53-unabhängige Signalkaskaden koordiniert werden. Nicht ganz auszuschließen wäre jedoch, dass eine p53-vermittelte Zellantwort zu einem deutlich früheren Zeitpunkt, oder über die Modifikation an einer anderen Phosphorylierungsstelle, noch nachweisbar wäre. Es bleibt zudem zu beachten, dass die Regulation von p53 durch Exposition mit NIR von Frank et al. nach einer deutlich höheren NIR-Dosis festgestellt wurde. So könnte der notwendige

Energieeintrag nach der hier verwendeten NIR-Dosis von 360 kJ/qm möglicherweise nicht ausreichen, um eine erhöhte Expression von p53 hervorzurufen.

Nek1

Nek1, als Mitglied der *NIMA-related* Kinasen, ist gemeinsam mit Proteinen aus den Polo- und Aurora-Kinasefamilien unter anderem für die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität verantwortlich [76]. Dabei interagiert es in der DNA-Schadensantwort mit bekannten DNA Reparaturproteinen, wie zum Beispiel 53BP1, welches wiederum Bindepartner für das Tumorsuppressorprotein p53 ist [82, 83]. Die Verbindung zur Reparatur von DNA-Schäden, die durch ionisierende Bestrahlung induziert werden, wurde in den letzten Jahren von allem von der Gruppe von Chen untersucht [84-89]. Dabei stellten sie unter anderem fest, dass Zellen mit einer Nek1-Defizienz, nach einem DNA-Schaden nicht mehr am G1/S- oder am M-Checkpoint arretieren, was auf einen direkten Einfluss von Nek1 auf diese hinweist. Scheinbar ist durch das Fehlen von Nek1 die Aktivierung der Checkpointkinasen Chk1 und Chk2 gestört. Da zudem auch die Interaktion mit Proteinen, die an der Regulation der Zentrosomenfunktion beteiligt sind [86], beschrieben wurde, einhergehend mit einer Promotion der Proliferation sowie Blockade der Apoptose in Nek1-defizienten Zellen [87, 88], stellte dieses Protein einen potentiellen Mitspieler bei der Veränderung der röntgeninduzierten Schadensantwort durch NIR dar.

Vor dem Hintergrund der fehlenden Checkpoint-Induktion in Nek1 defizienten Zellen wäre ein durch NIR erniedrigtes Level an Nek1 zum Zeitpunkt der Röntgenbestrahlung eine mögliche Erklärung für das erhöhte Auftreten mitotischer Katastrophen bzw. der höheren BrdU Inkorporation nach Röntgen. Es zeigte sich jedoch, dass die Expression des Nek1-Proteins in Fibroblasten 24 h nach der NIR Exposition zunächst dosisabhängig ansteigt und bei den beiden höheren verwendeten Dosen auf einem Niveau verbleibt.

Somit wäre eher eine protektive Wirkung, möglicherweise durch eine erhöhte genomische Stabilität und ggf. schneller aktivierten Zellzykluscheckpoints, sowie eine effizientere Zentrosomenregulation und schnellere DNA-Reparatur zu erwarten. Dass dies jedoch nicht der Fall ist, haben die DNA-Reparatur- und Proliferationsstudien, sowie die Bestimmung der mitotischen Katastrophen gezeigt. Tatsächlich zeigten aber auch Wei und Chen eine erhöhte Strahlenresistenz in Nek1-überexprimierenden Zellen. Auch da zeigte sich, dass Zellen mit einem erhöhten Nek1-Level zu einem geringeren Prozentsatz in die Apoptose nach strahleninduziertem DNA Schaden gehen, als normale Zellen [187].

Eine weitere Funktion von Nek1, die aus der Chen-Gruppe beschrieben wird, ist die Phosphorylierung des mitochondrialen VDAC1-Kanals [89]. Dieser reguliert die Permeabilität der Mitochondrienmembran und damit einhergehend die Freisetzung proapoptotischer Faktoren [90, 91]. Da Nek1 über seine Kinaseaktivität direkt an der Permeabilisierung der Mitochondrienmembran beteiligt ist, bedeutet eine erhöhte Level Nek1 möglicherweise eine erhöhte Kinaseaktivität, welche damit der Öffnung von VDAC-1 entgegenwirkt. Dadurch wird die Induktion der mitochondrial gesteuerten Apoptose unterbunden und erlaubt es geschädigten Zellen so möglicherweise diese zu umgehen und dank anderer, durch NIR beeinflusster, Signalkaskaden zudem noch in die Zellteilung zu gehen. Gestützt wird diese These von der Beobachtung, dass in Nek-1-defizienten Zellen die Permeabilität der Mitochondrien, und damit einhergehend die Letalität, deutlich erhöht ist [89]. Nicht auszuschließen bleibt jedoch, ob nicht das höhere Level an Nek1 auch einen negativen Einfluss auf die genomische Stabilität und Zellzykluskontrolle hat. Es gilt schließlich in den meisten Fällen, dass nicht zwangsläufig nur ein völliges Fehlen eines Proteins die Signalkaskade stört, sondern dass auch ein unphysiologisch hohes Level das zelluläre Gleichgewicht zum Zusammenbruch bringen kann. Meist ist ein genau ausbalanciertes Verhältnis von Bildung und Abbau essentiell für die ordnungsgemäße Funktionalität der Signalwege. Hier könnten Überexpressionsexperimente Klärung verschaffen. Würde die Überexpression von Nek1 in Abwesenheit von NIR nach einer Schadensinduktion mit ionisierender Bestrahlung vergleichbare Ergebnisse zeigen, so könnte der direkte Zusammenhang der Nek1-Expression mit den genannten Endpunkten gezeigt werden. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass Nek1 nur eines von vielen Elementen bei der durch NIR veränderten Schadensantwort der Zelle ist.

Um die Relevanz für mögliche Effekte *in vivo* festzustellen, wurden postnatale Mäuse des Stadiums P4/P5 mit 360 kJ/qm NIR bzw. Sham bestrahlt. Das dermale Rückengewebe wurde 24 h nach der Bestrahlung isoliert und die Nek1-Expression über RT-PCR-Analysen aus der so gewonnen RNA untersucht. Es zeigte sich auch hier stets ein höheres Nek1-Expressionslevel in den Gewebeproben der NIR bestrahlten Tiere. Vorausgesetzt, dass das veränderte Nek1 Level zu den hier beschriebenen Effekten beiträgt, bleibt es somit zu erwarten, dass ähnliche Veränderungen nach einer ionisierenden Bestrahlung durch die Exposition mit NIR auftreten würden. Um dies mit Sicherheit sagen zu können, müssten jedoch *in vivo* Bestrahlung der so vorbehandelten Mäuse mit, zum *in vitro* Versuch vergleichbaren, Röntgendosen durchgeführt werden. Da dies zudem ein 4 bis 24 stündige Nachinkubation erfordern würde, wäre das jedoch aus ethischen Gründen aufgrund der zu erwartenden Nebenwirkung bei

Ganzkörperbestrahlungen mit Dosen höher 2 Gy nicht vertretbar. Eine lokale Bestrahlung war mit der zur Verfügung stehenden Röntgenröhre nicht möglich.

PARP/PARG

PARP und PARG, sprich die Poly-ADP-Ribosepolymerase (PARP) und Poly-ADP-Riboseglycohydrolase (PARG), sind essentielle Proteine der Poly-ADP-Ribosylierung, welche wiederum einen essentiellen Mechanismus für das Überleben der Zelle darstellt. Sie ist beteiligt an der DNA-Reparatur, an der Mitose [100], an der Modulation der Chromatinstruktur [101], der Regulation intrazellulärer Transportvorgänge, der Transkription [102-105] sowie die Telomerregulation bis hin zum Zelltod [106].

In Bezug auf die DNA Reparatur konnte ein Zusammenhang sowohl mit der Einzelstrangbruchreparatur, als auch mit der Doppelstrangbruchreparatur beschrieben werden [30, 112]. Da zudem die Veränderung der PARG-Expression in Zusammenhang mit der Bildung mitotischer Katastrophen in Zusammenhang gebracht wird [30], stellten diese beiden Proteine weitere potentielle Kandidaten für eine Regulation durch die nahe Infrarotstrahlung dar.

Tatsächlich konnte nach der in vivo Bestrahlung von Mäusen gezeigt werden, dass NIR einen Einfluss auf das Transkriptionslevel dieser beiden Proteine hat. Analog zur Nek1-Expression zeigte sich auch hier ein stets höheres Expressionslevel an PARG in den Gewebeproben der NIR bestrahlten Tiere. Auch die PARP-1 Expression ist tendenziell erhöht. Damit lässt sich ein direkter Einfluss der nahen Infrarotbestrahlung auf den Prozess der Poly-ADP-Ribosylierung über die Expression der daran beteiligten Proteine feststellen. Interessanterweise zeigt sich jedoch keine Herunterregulation oder selektive Regulation eines der beiden Antagonisten. Somit kann auch nicht von einer PAR-Akkumulation oder einer reduzierten PAR-Produktion ausgegangen werden. Im Gegenteil, liegen beide Faktoren erhöht vor, muss angenommen werden, dass die Aktivität des ganzen Prozesses schneller und damit eigentlich auch effizienter ablaufen könnte.

In PARG-, als auch in PARP-1-defizienten Zellen konnten Masutani et al. eine erhöhte Sensitivität gegenüber den letalen Effekten ionisierender Strahlung, aber auch alkylierender Substanzen, feststellen [113]. Somit könnten die erhöhten Level möglicherweise den gegenteiligen Effekt, sprich eine erhöhte Resistenz gegenüber den röntgeninduzierten Schäden zeigen. Unter anderem könnte dies der Fall über eine erhöhte Transkriptionsaktivität durch eine erhöhte Poly-ADP-Ribosylierung sein [102-105], die möglicherweise im Umkehrschluss die Regulation anderer Proteine nachteilig beeinflussen kann.

Gezeigt wurde auch, dass eine Überexpression von PARG sich störend auf die Aktivität von PARP auswirkt und somit die Poly-ADP-Ribosylierung aus dem Gleichgewicht bringt [188]. Die gebildeten Poly-ADP-Riboseketten am PARP können dadurch ihre notwendige Länge für die Funktionalität nicht erreichen und daher notwendige Modifikationen an den Zielproteinen nicht mehr vornehmen. Die Beteiligung von PARP und PARG an der Chromatinmodulation lässt eine derartige Funktionsstörung auch für die Replikation problematisch werden. Ohne die Auflockerung des Chromatins ist keine Replikation der DNA möglich. So konnten Tulin et al. zeigen, dass bei fehlendem PARP oder einer Überexpression von PARG die Auflockerung des Chromatins fehl schlägt und so nicht mehr zugänglich für notwendige Modifikationen ist [188]. Da jedoch die Proliferation in den NIR behandelten Zellen nach Röntgenexposition nicht stärker gehemmt, sondern vielmehr gesteigert ist, scheint diese fehlerhafte Chromatinauflösung in den hier durchgeführten Experimenten nicht aufzutreten.

Tulin et al. zeigten aber auch, dass die Auswirkungen einer Überexpression von PARG durch eine gleichzeitige Hochregulation von PARP neutralisiert werden können [188]. Da durch Bestrahlung mit nahem Infrarot beide Gene hochreguliert werden, könnte davon ausgegangen werden, dass die Entstehung mitotischer Katastrophen in den *in vitro* Versuchen, auch wenn in Zusammenhang mit PARG bzw. PARP Defiziten beschrieben [30], somit nicht ursächlich auf die Veränderung der Expression beider zurückzuführen sind. Vielmehr scheint die Regulation der beiden Gene auf den durch NIR induzierten oxidativen Stress zurückzuführen zu sein. So konnte gezeigt werden, dass nach Exposition gegenüber subletalen Dosen von H₂O₂, PARG essentiell für die grundlegenden zellulären Funktionen wie Proliferation und DNA Reparatur ist [189] ist. Auch PARP wird als Reaktion der Zellen auf oxidativen Stress aktiviert [190]. Dieses wiederum spielt dann, in Zusammenarbeit mit PARG, eine essentielle Rolle bei der DNA Einzelstrangbruch- [112] und Basenexzisionsreparatur (BER) [190], welche zudem notwendig ist für die Entfernung von ROS-induzierten 8-oxo-dG Addukten [191]. Da in den *in vitro* Studien bereits gezeigt werden konnte, dass nicht nur ein erhöhtes endogenes ROS-Level zum Zeitpunkt der erhöhten Expression von PARP und PARG vorliegt, sondern auch mehr 8-oxo-dG Addukte, lässt sich hier möglicherweise ein Zusammenhang zur PARP und PARG-Regulation finden. So sind beide Proteine durch den NIR-induzierten oxidativen Stress bereits zum Zeitpunkt der Schadenssetzung durch Röntgen scheinbar durch den gesteigerten Bedarf der BER hochreguliert. Möglicherweise ist die frühzeitig aktivierte BER auch ein Grund für den zwar signifikanten, aber im Vergleich zum eigentlichen ROS-Level, eher moderaten Anstieg der 8-oxo-dG-Addukte in NIR vorbehandelten Zellen nach Röntgenexposition.

Somit ist die Regulation von PARG und PARP zwar durch NIR beeinflusst, scheint aber nicht ursächlich für die Erhöhung der röntgeninduzierten Schäden verantwortlich zu sein, sondern vielmehr diesen durch eine frühzeitig einsetzende Reparatur entgegenzuwirken. In wie weit eine derartige antagonisierende Wirkung tatsächlich Auswirkungen hat, müsste in Zellen mit einer verminderten PARP/PARG-Expression oder durch Inhibition der Aktivität beider nachgeprüft werden. Demnach müssten Zellen, in denen die Funktionalität beider eingeschränkt ist, ein noch höheres Schadenslevel in einer kombinierten Bestrahlung von NIR und Röntgen aufweisen. Darauf lassen auch die in der Literatur beschriebenen *Loss-of-Function* Experimente schließen [113-115]. Andererseits könnte aber auch gerade die erhöhte Expression und damit erhöhte PARG/PARP-abhängige Reparaturkapazität für die Resistenz der NIR vorbehandelten Zellen, trotz höherem Schadenslevel, gegenüber dem Zelltod (keine erhöhte Apoptose, keine Verminderung des klonogenen Überlebens), verantwortlich sein. Dies wiederum müsste aber erst durch eine zusätzlich gesteigerte Expression, zum Beispiel über eine künstliche Überexpression in entsprechend transfizierten Zellen, genauer untersucht werden.

4.6.2 Einfluss von NIR auf die Phosphorylierung von Proteinen

Reaktive Sauerstoffspezies haben eine vielfältige Wirkung auf Zellen. So wurde unter anderem gezeigt, dass ROS als Aktivator verschiedener Signalwege, wie auch der MAPKinase-Signalkaskade, fungieren [192]. Insbesondere H₂O₂-vermittelte ROS sind in der Lage, die Aktivierung des MAPK-Pathways über die Phosphorylierung von Erk1/2 am Thr 185 und Tyr 183 zu induzieren [135, 193]. Da verschiedene Gruppen zeigen konnten, dass NIR in der Lage ist, intrazelluläre reaktive Sauerstoffspezies zu induzieren [1, 15, 169], konnte davon ausgegangen werden, dass NIR eine Aktivierung des MAPKinase-Pathways induziert.

Die Signalkaskade der MAPKinase, auch Erk1/Erk2-Signalkaskade genannt, stimuliert vor allem das Wachstum und die Proliferation von Zellen. Damit assoziiert ist auch die Induktion positiver Regulationsmechanismen des Zellzykluses, und die Inaktivierung der Expression antiproliferativer Gene [96]. Vor allem ist die Aktivierung von Erk1/2 notwendig für das Fortschreiten der Zellen von G1- zur S-Phase im Zellzyklus. Zudem konnten Chae et al. zeigen, dass ROS über ihren Einfluss auf Erk eine Ursache für die Hyperamplifikation der Zentrosome und somit der Bildung von polynukleären Zellen sein können [135]. Somit war ein möglicher Einfluss dieser Signalkaskade auf die NIR-induzierten proliferationsfördernden Effekte nach Röntgenexposition, sowie auch das Fortschreiten im Zellzyklus trotz Schadens nicht auszuschließen.

Deshalb wurde die Aktivierung der MAPKinase über die Phosphorylierung von Erk1 und Erk 2 an Thr¹⁸³ und Tyr¹⁸⁵ 4 h nach Röntgenbestrahlung untersucht. Es zeigte sich zu diesem Zeitpunkt allerdings keinerlei Regulation der MAPKinase-Aktivierung, weder in der ausschließlich röntgenbestrahlten Population, noch in denen, welche mit NIR vorbehandelt wurden.

Chae et al. zeigten jedoch klar einen deutlichen Einfluss eines ROS induzierenden Agens auf die Aktivierung der MAPKinase und zudem die darauf folgende Bildung polynukleärer Zellen [135]. Beides ist in den hier durchgeführten Experimenten eigentlich gegeben; die Induktion von ROS durch Röntgen sowie durch NIR und die spätere Entstehung polynukleärer Zellen; vermehrt nach Exposition beider Strahlenarten. Da eine Auswirkung auf die Aktivierung der MAPKinase direkt nach NIR nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde diese analog der von Chae beschriebenen Ergebnisse direkt nach NIR zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. In der H₂O₂-Kontrolle zeigte sich ein vergleichbares Muster der Aktivierung der MAPKinase, mit einem schnellen Anstieg der Phosphorylierung und nachfolgend einer langsamen Reduktion bis 60 Minuten nach H₂O₂-Gabe. Interessanterweise zeigte sich auch in Sham bestrahlten Kontrollen eine Aktivierung der MAPKinase, die jedoch schon nach zwanzig Minuten nicht mehr nachweisbar ist. Dagegen zeigt sich eine langanhaltende Aktivierung von Erk1/2 in den NIR bestrahlten Populationen.

In einer, diese Doktorarbeit begleitenden Bachelorarbeit, wurde schließlich nachgewiesen, dass NIR in der untersuchten Dosis von 360 kJ/qm selbst keine Phosphorylierung von Erk1/2 an Thr¹⁸⁵ und Tyr¹⁸³ induziert. Der Grund könnte die hier verwendete Dosis von 360 kJ/qm sein. Die von Schröder et al. beschriebene Phosphorylierung von Erk1/2 erfolgte nach einer 10fach höheren Dosis [15]. Trotzdem hatte NIR einen Effekt auf die Phosphorylierung von Erk1/2: Es stabilisierte die durch den Medienwechsel nach der Bestrahlung hervorgerufene Phosphorylierung [193]. Als Ursache für diese Stabilisierung könnte ein direkter oder auch indirekter Einfluss von NIR auf die endogenen Phosphatasen sein, welche für die Dephosphorylierung von Erk1/2 verantwortlich sind.

Diese Enzyme werden in zwei Gruppen eingeteilt, in Tyrosin-Phosphatasen, sogenannte PTPs, und Serin/Threonin-Phosphatasen sogenannte PSPs [194]. Der Abbau der Phosphorylierung der MAPKinasen wird durch *dual specificity phosphatases* (DUSP) durchgeführt [195]. Diese gehören zu den Tyrosin-Phosphatasen, haben jedoch ein zusätzliches aktives Zentrum mit Serin/Threonin-Phosphataseaktivität. Beide Phosphatasegruppen können durch Oxidation über ROS/NO_x oxidiert und damit inaktiviert werden. Dies geschieht vor allem über die Oxidation am SH-Rest der Cysteine. Ist die Funktionalität der Phosphatasen gestört, so

unterbleibt die Deaktivierung spezifischer Proteine und damit auch die Deaktivierung der zugehörigen Signalkaskaden.

Zwar lässt sich 4 h nach Röntgenbestrahlung kein Effekt mehr auf die MAPKinase-Aktivierung feststellen, es zeigte sich aber ein äußerst interessanter Einfluss von der NIR-Vorbehandlung auf die röntgeninduzierte Phosphorylierung von Erk 1/2 15 Minuten nach Bestrahlung in der Arbeit von D. Westmeier. Während Röntgenstrahlung allein einen dosisabhängigen Anstieg der Aktivierung der MAPKinase bewirkt, hemmt die NIR-Vorbestrahlung die Phosphorylierung in allen Röntgendosen gleichmäßig [193]. Dieses gegenläufige Bild lässt auf einen völlig anderen Mechanismus als den, welcher die Effekte direkt nach NIR hervorruft, schließen.

Somit wirkt die NIR-Bestrahlung der Aktivierung der MAPKinase durch röntgeninduzierte Schädigung der Zelle scheinbar entgegen. Es müsste daher genauer untersucht werden, welchen langfristigen Effekt eine verminderte Aktivierung von Erk1/2 in nachfolgenden Verlauf hat. Anzunehmen wäre normalerweise eine Hemmung der Proliferation, sowie eine Arretierung der Zellen am G1/S-Checkpoint [96]. Dies ist jedoch gerade nicht der Fall: Vielmehr laufen mehr Zellen trotz bestehender Schäden in die S-Phase. Möglicherweise wird eine potentiell proliferationshemmende Wirkung einer verminderten Aktivierung der Signalkaskade durch die Aktivierung anderer Signalwege antagonisiert und tritt somit nicht zu Tage, bzw. wird während der nachfolgenden 24 h neutralisiert.

Yan et al. konnten zeigen, dass aktiviertes Erk 1/2 im Nachfolgenden Einfluss auf die Aktivierung von NudE-like (Nudel) nimmt, was die Bildung der Spindel und damit einhergehend die Mitose beeinflusst. Hier könnte ein Zusammenhang zu den erhöhten Raten an mitotischen Katastrophen bestehen. So konnten Yan et al. nachweisen, dass aktiviertes Erk 1/2 die Phosphorylierung von Nudel katalysiert, welches als phospho-Nudel einen Komplex mit Lis1 bildet und dadurch die Pol-gerichtete Wanderung von Dynein koordiniert. Dynein wiederum vermittelt den Transport der Kinetochorproteine entlang der Mikrotubuli zum Spindelpol. Wird nun die Aktivierung von Nudel unterbunden, unterbleibt die Koordination der Dynein-Wanderung und damit einhergehend die geordnete Spindelbildung. Es zeigt sich, dass eine Hemmung der Dyneinwanderung eine Inhibition des Spindelcheckpoints zur Folge hat [196].

Da gezeigt werden konnte, dass eine Vorbehandlung mit NIR vor Röntgenbestrahlung eine Reduktion der Phosphorylierung von Erk 1/2 zur Folge hat [193], resultiert hieraus möglicherweise ebenfalls eine Reduktion der Aktivierung von Nudel. Die deutlich erhöhte Rate an mitotischen Katastrophen, die durch Vorbehandlung mit NIR nach Röntgenexposition

entstehen, stützt diesen möglichen Zusammenhang, da gezeigt wurde, dass MCs unter anderem durch eine Störung des Spindelapparates entstehen können [23].

Ein zusätzlicher Einfluss hierauf könnte auch die verlangsamte Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen, nachgewiesen über γ H2AX, sein. γ H2AX stellt ein weiteres phosphoryliertes Molekül dar, auf das NIR einen Einfluss nimmt. Eine Vorbehandlung mit NIR vor der Röntgenbestrahlung bewirkte ein signifikant höheres Phosphorylierungslevel von H2AX 4 h nach 4 Gy (in G1-Zellen) bzw. 10 Gy (in der Gesamtpopulation) im Vergleich zur Kontrolle; wobei jedoch keine erhöhte Induktion der Phosphorylierung nachgewiesen werden konnte.

Die Dephosphorylierung von γ H2AX erfolgt über die Serin/Threonin-Phosphatasen PP2A und PP4 [197, 198]. Chowhudry et al. zeigten, dass eine Inaktivierung von PP2A den Abbau von γ H2AX verhindert und damit eine gestörte DNA-Reparatur bewirkt. Zusätzlich werden die Zellen sensibler gegenüber DNA-Schäden. Der Einfluss von PP2A ist dabei unabhängig von der Aktivität von ATM, ATR und DNA-PK [197].

Möglicherweise wirkt sich NIR auch hier auf die Phosphataseaktivität, in dem Fall auf die Aktivität von PP2A bzw. PP4 aus, und verursacht damit eine Störung der DNA-Reparatur durch einen ineffizienten Abbau von γ H2AX-Foci. Diese Wirkung könnte auf eine Oxidation der spezifischen Phosphatasen zurückzuführen sein. Da das γ H2AX-Level jedoch nach 24 h vollständig auf Kontrollniveau zurück gegangen ist, liegt die Vermutung nahe, dass eine Reaktivierung der Phosphatasen im folgenden Verlauf erfolgen muss. Diesbezüglich sollte im Zuge weiterer Untersuchungen die Phosphataseaktivität in Abhängigkeit der Bestrahlung bestimmt werden. Denkbar ist, auch auf Grund der hier gezeigten Ergebnisse, dass sich unterschiedliche Aktivitätsmuster der Phosphatasen nach den verschiedenen Bestrahlungsvarianten zeigen. Lässt man alle anderen Merkmale außer Acht und betrachtet nur den Grad der Phosphorylierung, so würde die reduzierte MAPKinaseaktivierung eher auf eine erhöhte Phosphataseaktivität zum Zeitpunkt der Röntgenstrahlung hinweisen. Dem entgegen steht wiederum das höhere Phosphorylierungslevel von H2AX nach 4 h. Möglich wäre auch eine selektive Blockierung der Phosphatasen, doch dies bleibt zunächst reine Spekulation.

4.6.3 Einfluss von NIR auf die Gap-Junction vermittelte Zell-Zell-Kommunikation

In einer weiteren begleitenden Bachelorarbeit wurde der Einfluss von NIR, auch in Kombination mit Röntgen, auf die Gap-Junction-vermittelte Zell-Zell-Kommunikation in humanen Keratinozyten (HaCaT) untersucht [182]. Ziel war dabei festzustellen in wie weit NIR Einfluss auf die Zell-Zell-Kommunikation nehmen und damit mögliche Bystandereffekte auslösen kann. Die Analysen erfolgten im Scratch-Assay, welcher die Kommunikation über Gap-Junctions, anhand der Weiterleitung von Lucifer Yellow, sichtbar macht [199].

Bei diesen Untersuchungen konnte ein deutlicher Einfluss von naher Infrarotstrahlung auf die Kommunikation festgestellt werden. Dieser konnte bereits direkt nach der Bestrahlung, sowie auch noch 4 h danach nachgewiesen werden. 24 h später, also zum Zeitpunkt der Schadenssetzung durch Röntgen, konnte kein Unterschied zwischen Sham und NIR bestrahlten Zellen mehr festgestellt werden. Interessanterweise zeigte sich nach einer Röntgenexposition beider Zellgruppen ein deutlicher Einfluss der NIR-Vorbehandlung (siehe Anhang). Bereits nach einer Exposition mit 2 Gy Röntgen zeigte sich in den NIR-vorbehandelten Zellen eine signifikante Erhöhung der Zell-Zell-Kommunikation über Gap-Junctions. Dieser Effekt war bei einer Bestrahlung mit 4 Gy sogar noch erhöht. Bei einer Dosis von 10 Gy kehrte sich dieser Effekt um und die Diffusionsweite des Farbstoffes stieg in der nicht NIR-vorbehandelten Probe stark an, wogegen sie in der NIR-vorbehandelten Population sank. Auch hier zeigte sich, wie bei einigen anderen untersuchten Endpunkten auch, dass sich der Einfluss der NIR-Vorbehandlung nach einer bestimmten Schwellendosis an Röntgen umkehren kann. Es besteht die Vermutung, dass der implizierte Schaden bei einer Dosis von 10 Gy so hoch ist, dass die Zellen das Öffnungsverhalten der Gap Junctions nicht mehr kontrollieren können. Die Eigenschaft der Röntgenstrahlung, die Entfaltung und somit möglicherweise irreversible Denaturierung von Proteinen beeinflussen zu können, könnte zur Schädigung der Connexine führen. Diese sind so möglicherweise nicht mehr in der Lage, den Diffusionsfluss zu regulieren [182]. Betrachtet man in diesem Zusammenhang die Untersuchungen von Frank et al. über die Exposition naher Infrarotstrahlung in Kombination mit UV-Strahlung [11], so kann hier ein möglicher Zusammenhang gefunden werden. Die Gruppe konnte zeigen, dass die Vorbehandlung von Zellen mit nahem Infrarot diesen eine höhere Resistenz gegenüber der UV-B induzierten Zytotoxizität verleiht. Betrachtet man dies im Zusammenhang mit dem Nachweis, dass NIR die Gap-Junction vermittelte Zell-Zell-Kommunikation beeinflusst, so könnte die rückläufige Kommunikation bei NIR-Vorbehandlung und einer Röntgendosis von 10 Gy auch als möglicher Schutzeffekt, ausgelöst durch die Vorbehandlung mit NIR, betrachtet werden. Die Induktion eines entsprechend

hohen Schadens, wie sie bei einer Dosis von 10 Gy erfolgt, könnte somit eine stärkere Blockierung der Gap Junctions und der damit einhergehenden Zellkommunikation zur Folge haben. So könnte wiederum die Weiterleitung von Signalmolekülen die Apoptose, Nekrose oder auch Seneszenz auslösen können, unterbunden werden.

Im Umkehrschluss zeigt dies jedoch auch, dass die erhöhte Kommunikation, die nach den niedrigeren Röntgendosen nachgewiesen wurden, möglicherweise auch zur veränderten Schadensantwort der Zellen nach der Röntgenexposition beiträgt. Da sowohl der Zeitpunkt der kommunikationsfördernden Wirkung – direkt nach der Schadensinduktion durch Röntgen – als auch die Wirkung an sich, nämlich die Erhöhung der Kommunikation, eine deutliche Übereinstimmung mit den anderen hier beschriebenen Effekten zeigt, muss ein Zusammenhang zwischen Kommunikation und Auswirkung bestehen [182].

Der starke Einfluss auf die Kommunikation direkt nach NIR lässt vermuten, dass eine Schadensinduktion in diesem Zeitraum möglicherweise eine weitere Potenzierung einiger Endpunkte nach sich ziehen könnte. Ebenso denkbar ist nicht nur, wie von L. Schmidke vermutet [182], ein Einfluss auf die posttranslationale Modifikation der Connexine und damit einhergehend die Funktionalität der Gap Junctions, sondern auch bereits auf die Expression der zugehörigen Gene. Von großem Interesse bleibt vor allem die Frage, ob die Gap-Junction-vermittelte Zell-Zell-Kommunikation auch im *in vivo* Versuch beeinflusst wäre.

Wogegen der direkte visuelle Nachweis der Zell-Zell-Kommunikation *in vivo* nur äußerst schwierig nachvollzogen werden kann, so sollte jedoch eine Veränderung der Connexin-Expressionslevel oder auch der posttranslationalen Modifikationen, sofern diese auftreten, in nachfolgenden Untersuchungen überprüft werden.

4.7 Schlussfolgerung

Es konnte nachgewiesen werden, dass ein signifikanter Anstieg an intrazellulären ROS Level und eine verzögerte DNA Schadensreparatur sowie eine vermehrte Bildung von mitotischen Katastrophen durch die Kombination von physiologischen Dosen an NIR und klinisch relevanten Dosen an Röntgen induziert werden kann. Es konnte außerdem ein direkter Einfluss auf die Mitochondrien, sowie auf an der DNA Schadensantwort und Reparatur beteiligten Gene und Prozesse gezeigt werden. Gerade auch der Einfluss auf die Expression wichtiger Signalmoleküle konnte bereits in ersten *in vivo* Versuchen reproduziert werden.

Diese Funde könnten von klinischer Relevanz bei einer Strahlentherapie sein, da einerseits die verzögerte DNA Schadensreparatur und die erhöhten ROS Level förderlich für die Elimination von Tumorzellen sein könnten, andererseits die Kombination beider Strahlenqualitäten die

Bildung mitotischer Katastrophen fördert, was möglicherweise Tumoren erlaubt, Resistenzen gegen die Krebstherapie zu bilden oder die genetische Stabilität des gesunden Gewebes schädigt. Da dies auch individuell Probanden- bzw. Tumor-abhängig sein könnte, verbleibt zunächst nur festzustellen, dass die unbedachte Exposition von Patienten mit NIR während einer Krebstherapie mehr Aufmerksamkeit in der zukünftigen Krebsforschung braucht.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war nachzuweisen, ob eine Behandlung mit naher Infrarotstrahlung (NIR), appliziert vor der Exposition mit ionisierender Röntgenstrahlung, den Zellen einen Schutz gegenüber letzterer verleiht. Basis dafür waren vor allem die Publikationen von Menezes und Frank et al. die zeigen konnten, dass eine NIR-Vorbehandlung einen protektiven Effekt auf Zellen gegenüber UV-induzierten Schäden hat [7, 11].

Es wurden dermale und retinale Zelllinien verwendet, da beide Gewebe einer natürlichen Exposition mit nahem Infrarot, in Dosen wie hier verwendet, ausgesetzt sein können [133, 134]. Als dermale Zelllinien kamen murine NIH/3T3 Fibroblasten und humane HaCaT Keratinozyten, sowie R28 retinale Vorläuferzellen aus der Ratte als retinale Zelllinie zum Einsatz. Die Dosen der Röntgenbestrahlung wurden so gewählt, dass diese, so weit möglich, denen der radiologischen Tumorthherapie entsprechen [132].

Zur Feststellung eines potentiell protektiven Effektes wurden Proliferationsstudien über BrdU-Aufnahmeraten und Zellzyklusanalysen durchgeführt. Die genomische Stabilität wurde über die Entstehung mitotischer Katastrophen bestimmt. Frühe und späte apoptotische Ereignisse wurden über TUNEL-Markierungen, sowie FACS Analysen mit AnnexinV und Propidium Iodid nachgewiesen. Zudem wurden DNA Reparaturstudien über die Induktion und den Abbau von phosphoryliertem H2AX, sowie die Induktion reaktiver Sauerstoffspezies und den Einfluss auf die mitochondriale Masse untersucht. Im Zuge der Aufklärung des Mechanismus der hinter den, durch eine NIR-Vorbehandlung hervorgerufenen Veränderungen steht, wurden Expressions- und Aktivierungslevel von potentiellen beteiligten Proteinen, wie p53, Nek1, PARG und PARP-1 sowie die Aktivierung der MAPKinase nachgewiesen.

Entgegen den ursprünglichen Erwartungen konnte kein protektiver Effekt, sondern vielmehr eine Verstärkung der röntgeninduzierten, zellulären Veränderungen nachgewiesen werden. In allen drei Zelllinien bewirkte eine NIR-Behandlung mit nachfolgend applizierter Röntgenbestrahlung eine Erhöhung der, über mitotische Katastrophen bestimmten, genomischen Instabilität. Weiterhin wurde festgestellt, dass NIR der röntgeninduzierten Hemmung der Proliferation entgegenwirkt und diese in Einzelfällen sogar bis auf das Kontrollniveau reaktivieren kann. In den DNA-Reparaturstudien konnte zwar keine gesteigerte Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen festgestellt werden, aber eine deutlich verlangsamte Reparatur dieser im Vergleich zu ausschließlich röntgenbestrahlten Zellen.

Ebenso wurde eine deutlich erhöhte Induktion von reaktiven Sauerstoffspezies durch Röntgen in NIR vorbehandelten Zellen gefunden. Auch die Bildung von ROS-induzierten 8-oxo-dG Addukten war in kombiniert bestrahlten Zellen signifikant erhöht.

Ein Einfluss auf die Mitochondrien, explizit die mitochondriale Masse, durch NIR konnte ebenfalls festgestellt werden. So zeigte sich in den NIH/3T3 Fibroblasten und R28 retinalen Vorläuferzellen eine Erhöhung der mitochondrialen Masse durch NIR zum Zeitpunkt der Röntgenbestrahlung. In HaCaT Keratinozyten konnte eine solche Erhöhung jedoch nicht nachgewiesen werden.

Erste mechanistische Untersuchungen zum Einfluss von NIR auf die röntgeninduzierte Strahlenantwort der Zellen zeigten, dass diese scheinbar p53-unabhängig verursacht werden. Gleichzeitig zeigte sich aber eine NIR-induzierte erhöhte Expression von Nek1 zum Zeitpunkt der Röntgenbestrahlung, sowohl in *in vitro* als auch in *in vivo* Experimenten. In *in vivo* bestrahlten Geweben konnte zudem eine erhöhte Expression der hauptverantwortlichen Proteine der Poly-ADP-Ribosylierung, PARG und PARP-1 nachgewiesen werden.

Auf die Aktivierung des MAPKinase Signalweges über die Phosphorylierung von Erk1/2 zeigte NIR einen bivalenten Einfluss. Direkt nach der NIR Exposition zeigte sich keine direkte Aktivierung, jedoch eine stabilisierende Wirkung der zytokininduzierten Phosphorylierung von Erk1/2. Was darauf hin deutet, dass hier ein möglicher Einfluss auf die endogenen Phosphatasen vorliegt. Hingegen nach der Röntgenexposition zeigte sich in NIR-vorbehandelten Zellen eine deutliche Hemmung der MAPKinase Aktivierung, deren Hintergrund noch verborgen bleibt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nahe Infrarotstrahlung keinen protektiven Einfluss gegenüber röntgeninduzierten Schäden bietet, sondern vielmehr den zellulären Schutzmechanismen zur Sicherung der genomischen Integrität entgegenwirkt. In Anbetracht der Tatsache, dass die verwendeten Zelltypen und Röntgendosen, relevant für die Strahlentherapie von Tumoren sind, und zudem die NIR-Exposition der natürlichen entspricht, sind die hier vorliegenden Ergebnisse durchaus therapierelevant. Dies ist insbesondere der Fall, da die erhöhte Schadensinduktion nicht nur eine potentiell effizientere Tumorabtötung bedeuten könnte, sondern auch, dass umliegendes Normalgewebe eine stärkere Schädigung durch Streustrahlung erfahren und daraus resultierend die genomische Integrität verloren gehen könnte. Inwieweit dies tatsächlich der Fall ist, muss jedoch noch in nachfolgenden Studien untersucht werden.

6 Anhang

6.1 Abbildungen zur Diskussion über den Einfluss von NIR auf die GAP-Junctions

Im nachfolgenden dargestellt sind die Ergebnisse zur Untersuchung des Einflusses von NIR auf die Gap-Junction vermittelte Zell-Zell-Kommunikation aus der Bachelorarbeit von Lisa Schmidke (BSc).

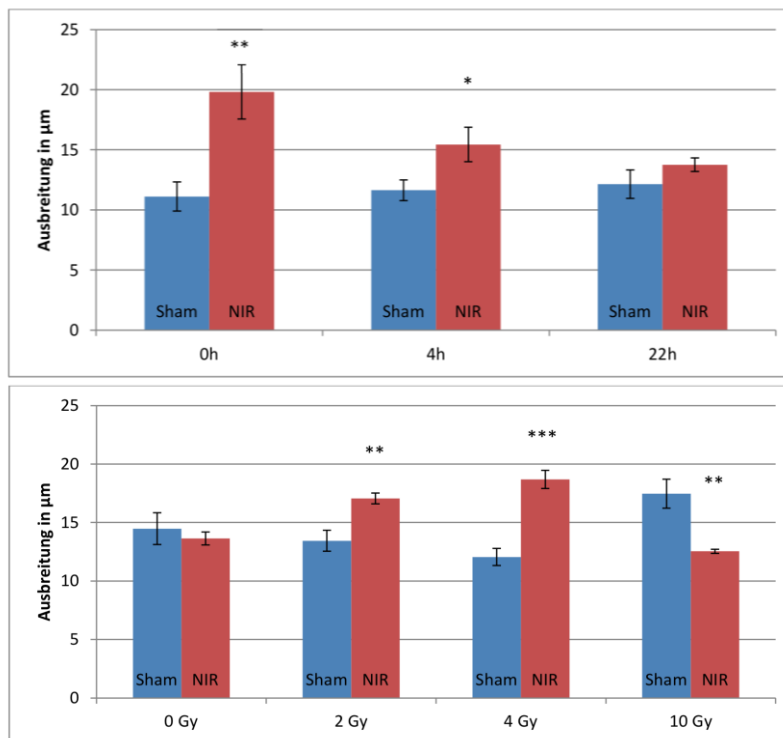


Abbildung 50: NIR verstärkt die Gap-Junction vermittelte Zell-Zell-Kommunikation direkt und nach der Röntgenexposition.

Oben: Direkt nach der Bestrahlung mit NIR, sowie 4 h später, ist die Diffusionsrate der bestrahlten Probe deutlich höher als die der unbestrahlten Kontrolle. Die Ausbreitung in μm bezieht sich auf die durchschnittliche Entfernung des vom Scratch fort diffundierenden Fluoreszenzfarbstoffs Lucifer Yellow. Der Scratch wurde zu den Zeitpunkten 0 h, 4 h und 22 h nach der Bestrahlung durchgeführt. Die Diffusionsweite ist direkt nach der Bestrahlung mit NIR deutlich erhöht. Auch nach 4 Stunden zeigt die NIR-vorbehandelte Probe eine höhere Diffusionsweite im Vergleich zur Kontrolle, die sich nach 22h wieder auf Kontrollniveau angeglichen hat.

Unten: Direkt nach einer Röntgenbestrahlung mit 2 und 4 Gy ist die Diffusionsweite der NIR-vorbehandelten Probe signifikant erhöht; durch die Bestrahlung mit 10 Gy kehrt sich dieser Effekt um. Die Ausbreitung in μm bezieht sich auf die durchschnittliche Entfernung des vom Scratch fort diffundierenden Fluoreszenzfarbstoffs Lucifer Yellow. Der Scratch wurde 0 h nach der Bestrahlung durchgeführt. Die 0 Gy Probe zeigt keine Veränderung in der Ausbreitung des Fluoreszenzfarbstoffs. Nach der Bestrahlung mit 2 und 4 Gy steigt die Diffusionsweite der NIR-vorbehandelten Probe, die der Kontrolle bleibt jedoch unverändert. Nach einer Bestrahlung mit 10 Gy steigt die Diffusionsweite der Kontrolle, wohingegen die NIR-vorbehandelte Probe keine Veränderung aufweist.

Die Graphen zeigen die Mittelwerte ($\pm\text{SD}$) von je drei unabhängig ausgeführten Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte über *two-tailed students-t-test* aus drei unabhängigen Versuchen (CI =95%, * P<0,05, ** P<0,01).

Literaturverzeichnis

1. König, A., *Untersuchungen zum Einfluss naher Infrarotstrahlung und deren Kombination mit ionisierender Strahlung auf retinale 3D-Zellkulturen und Gewebe*, in *Faculty for Biology, Department of Developmental Biology and Neurogenetics* 2011, Technical University: Darmstadt. p. 81.
2. Hamblin, M.R., *Mechanisms of low-level-light therapy*. Photobiological Science Online, 2008.
3. Toyokawa, H., et al., *Promotive effects of far-infrared ray on full-thickness skin wound healing in rats*. Exp Biol Med (Maywood), 2003. **228**(6): p. 724-9.
4. Whelan, H.T., et al., *Effect of NASA light-emitting diode irradiation on wound healing*. J Clin Laser Med Surg, 2001. **19**(6): p. 305-14.
5. Bibikova, A. and U. Oron, *Promotion of muscle regeneration in the toad (Bufo viridis) gastrocnemius muscle by low-energy laser irradiation*. Anat Rec, 1993. **235**(3): p. 374-80.
6. Wong-Riley, M.T., et al., *Light-emitting diode treatment reverses the effect of TTX on cytochrome oxidase in neurons*. Neuroreport, 2001. **12**(14): p. 3033-7.
7. Menezes, S., et al., *Non-coherent near infrared radiation protects normal human dermal fibroblasts from solar ultraviolet toxicity*. J Invest Dermatol, 1998. **111**(4): p. 629-33.
8. Karu, T., L. Pyatibrat, and G. Kalendo, *Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro*. J Photochem Photobiol B, 1995. **27**(3): p. 219-23.
9. Passarella, S., et al., *Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium-neon laser*. FEBS Lett, 1984. **175**(1): p. 95-9.
10. Wilden, L. and R. Karthein, *Import of radiation phenomena of electrons and therapeutic low-level laser in regard to the mitochondrial energy transfer*. J Clin Laser Med Surg, 1998. **16**(3): p. 159-65.
11. Frank, S., et al., *Infrared radiation induces the p53 signaling pathway: role in infrared prevention of ultraviolet B toxicity*. Exp Dermatol, 2006. **15**(2): p. 130-7.
12. Frank, S., et al., *Infrared radiation affects the mitochondrial pathway of apoptosis in human fibroblasts*. J Invest Dermatol, 2004. **123**(5): p. 823-31.
13. Kim, G.J., G.M. Fiskum, and W.F. Morgan, *A role for mitochondrial dysfunction in perpetuating radiation-induced genomic instability*. Cancer Res, 2006. **66**(21): p. 10377-83.
14. Schieke, S., et al., *Infrared-A radiation-induced matrix metalloproteinase 1 expression is mediated through extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in human dermal fibroblasts*. J Invest Dermatol, 2002. **119**(6): p. 1323-9.
15. Schroeder, P., et al., *Cellular response to infrared radiation involves retrograde mitochondrial signaling*. Free Radic Biol Med, 2007. **43**(1): p. 128-35.

-
16. Williams, P.M. and S. Fletcher, *Health effects of prenatal radiation exposure*. Am Fam Physician, 2010. **82**(5): p. 488-93.
 17. Fenech, M., *The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations*. Environ Health Perspect, 1993. **101 Suppl 3**: p. 101-7.
 18. Erenpreisa, J.A., et al., *Release of mitotic descendants by giant cells from irradiated Burkitt's lymphoma cell line*. Cell Biol Int, 2000. **24**(9): p. 635-48.
 19. Ianzini, F., et al., *Activation of meiosis-specific genes is associated with depolyploidization of human tumor cells following radiation-induced mitotic catastrophe*. Cancer Res, 2009. **69**(6): p. 2296-304.
 20. Ianzini, F. and M.A. Mackey, *Development of the large scale digital cell analysis system*. Radiat Prot Dosimetry, 2002. **99**(1-4): p. 289-93.
 21. Prieur-Carrillo, G., et al., *Computerized video time-lapse (CVTL) analysis of the fate of giant cells produced by X-irradiating EJ30 human bladder carcinoma cells*. Radiat Res, 2003. **159**(6): p. 705-12.
 22. Roninson, I.B., E.V. Broude, and B.D. Chang, *If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells*. Drug Resist Updat, 2001. **4**(5): p. 303-13.
 23. Castedo, M., et al., *Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition*. Oncogene, 2004. **23**(16): p. 2825-37.
 24. Andreassen, P.R., et al., *Neither p21WAF1 nor 14-3-3sigma prevents G2 progression to mitotic catastrophe in human colon carcinoma cells after DNA damage, but p21WAF1 induces stable G1 arrest in resulting tetraploid cells*. Cancer research, 2001. **61**(20): p. 7660-8.
 25. Margottin-Goguet, F., et al., *Prophase destruction of Emi1 by the SCF(betaTrCP/Slimb) ubiquitin ligase activates the anaphase promoting complex to allow progression beyond prometaphase*. Developmental cell, 2003. **4**(6): p. 813-26.
 26. Swanson, P.E., et al., *Spontaneous premature chromosome condensation, micronucleus formation, and non-apoptotic cell death in heated HeLa S3 cells. Ultrastructural observations*. Am J Pathol, 1995. **146**(4): p. 963-71.
 27. Ianzini, F. and M.A. Mackey, *Spontaneous premature chromosome condensation and mitotic catastrophe following irradiation of HeLa S3 cells*. Int J Radiat Biol, 1997. **72**(4): p. 409-21.
 28. Roninson, I.B., *Tumor cell senescence in cancer treatment*. Cancer Res, 2003. **63**(11): p. 2705-15.
 29. Loffler, H., et al., *Structure meets function--centrosomes, genome maintenance and the DNA damage response*. Exp Cell Res, 2006. **312**(14): p. 2633-40.
 30. Ame, J.C., et al., *Radiation-induced mitotic catastrophe in PARG-deficient cells*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 12): p. 1990-2002.

31. Nabha, S.M., et al., *Combretastatin-A4 prodrug induces mitotic catastrophe in chronic lymphocytic leukemia cell line independent of caspase activation and poly(ADP-ribose) polymerase cleavage*. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2002. **8**(8): p. 2735-41.
32. Susin, S.A., et al., *Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor*. Nature, 1999. **397**(6718): p. 441-6.
33. Joza, N., et al., *Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death*. Nature, 2001. **410**(6828): p. 549-54.
34. Erenpreisa, J., et al., *Segregation of genomes in polyploid tumour cells following mitotic catastrophe*. Cell Biol Int, 2005. **29**(12): p. 1005-11.
35. Apel, K. and H. Hirt, *Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction*. Annu Rev Plant Biol, 2004. **55**: p. 373-99.
36. Turrens, J.F., *Mitochondrial formation of reactive oxygen species*. J Physiol, 2003. **552**(Pt 2): p. 335-44.
37. ICMG. *free radical science*. 2011 [cited 2011 24.08.2011]; Available from: <http://www.freeradicalscience.com/>.
38. Diaz Vivancos, P., et al., *A nuclear glutathione cycle within the cell cycle*. The Biochemical journal, 2010. **431**(2): p. 169-78.
39. Simon, H.U., A. Haj-Yehia, and F. Levi-Schaffer, *Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction*. Apoptosis : an international journal on programmed cell death, 2000. **5**(5): p. 415-8.
40. Murley, J.S., et al., *SOD2-mediated effects induced by WR1065 and low-dose ionizing radiation on micronucleus formation in RKO human colon carcinoma cells*. Radiation research, 2011. **175**(1): p. 57-65.
41. Brigelius-Flohe, R. and M.G. Traber, *Vitamin E: function and metabolism*. The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 1999. **13**(10): p. 1145-55.
42. Higdon, J.V. and B. Frei, *Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions*. Critical reviews in food science and nutrition, 2003. **43**(1): p. 89-143.
43. Ernster, L. and G. Schatz, *Mitochondria: a historical review*. J Cell Biol, 1981. **91**(3 Pt 2): p. 227s-255s.
44. Ude, J. and M. Koch, *Die Zelle - Atlas der Ultrastruktur*. 3. Auflage ed2002, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. 328.
45. ICMG. *mitochondria research*. 2011 [cited 2011 24.08.2011]; Available from: <http://www.mitochondrial.net/>.
46. Andreu, A.L., et al., *Exercise intolerance due to mutations in the cytochrome b gene of mitochondrial DNA*. The New England journal of medicine, 1999. **341**(14): p. 1037-44.

-
47. Holt, I.J., A.E. Harding, and J.A. Morgan-Hughes, *Mitochondrial DNA polymorphism in mitochondrial myopathy*. Human genetics, 1988. **79**(1): p. 53-7.
 48. DiMauro, S., et al., *Mitochondrial myopathies*. Journal of inherited metabolic disease, 1987. **10 Suppl 1**: p. 113-28.
 49. Wallace, D.C., et al., *Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy*. Science, 1988. **242**(4884): p. 1427-30.
 50. Naess, K., et al., *MtDNA mutations are a common cause of severe disease phenotypes in children with Leigh syndrome*. Biochimica et biophysica acta, 2009. **1787**(5): p. 484-90.
 51. Parfait, B., et al., *The neurogenic weakness, ataxia and retinitis pigmentosa (NARP) syndrome mtDNA mutation (T8993G) triggers muscle ATPase deficiency and hypocitrullinaemia*. European journal of pediatrics, 1999. **158**(1): p. 55-8.
 52. Hirano, M., Y. Nishigaki, and R. Marti, *Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE): a disease of two genomes*. The neurologist, 2004. **10**(1): p. 8-17.
 53. Brand, M.D. and D.G. Nicholls, *Assessing mitochondrial dysfunction in cells*. The Biochemical journal, 2011. **435**(2): p. 297-312.
 54. Butow, R.A. and N.G. Avadhani, *Mitochondrial signaling: the retrograde response*. Molecular cell, 2004. **14**(1): p. 1-15.
 55. Liu, Z. and R.A. Butow, *Mitochondrial retrograde signaling*. Annual review of genetics, 2006. **40**: p. 159-85.
 56. Ryan, M.T. and N.J. Hoogenraad, *Mitochondrial-nuclear communications*. Annual review of biochemistry, 2007. **76**: p. 701-22.
 57. Pierangeli, A., et al., *Interferon-induced gene expression in cervical mucosa during human papillomavirus infection*. International journal of immunopathology and pharmacology, 2011. **24**(1): p. 217-23.
 58. Lee, H.R., et al., *Viral interferon regulatory factors*. Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research, 2009. **29**(9): p. 621-7.
 59. Zhang, X.P., F. Liu, and W. Wang, *Coordination between cell cycle progression and cell fate decision by the p53 and E2F1 pathways in response to DNA damage*. The Journal of biological chemistry, 2010. **285**(41): p. 31571-80.
 60. Sinthupibulyakit, C., et al., *p53 Protects lung cancer cells against metabolic stress*. International journal of oncology, 2010. **37**(6): p. 1575-81.
 61. Choi, J. and L.A. Donehower, *p53 in embryonic development: maintaining a fine balance*. Cellular and molecular life sciences : CMLS, 1999. **55**(1): p. 38-47.
 62. Zheltukhin, A.O. and P.M. Chumakov, *Constitutive and induced functions of the p53 gene*. Biochemistry. Biokhimiia, 2010. **75**(13): p. 1692-721.

-
63. Puzio-Kuter, A.M., *The Role of p53 in Metabolic Regulation*. Genes & cancer, 2011. **2**(4): p. 385-91.
 64. Balaburski, G.M., R.D. Hontz, and M.E. Murphy, *p53 and ARF: unexpected players in autophagy*. Trends in cell biology, 2010. **20**(6): p. 363-9.
 65. Mihara, M., et al., *p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria*. Molecular cell, 2003. **11**(3): p. 577-90.
 66. Eizenberg, O., et al., *Direct involvement of p53 in programmed cell death of oligodendrocytes*. The EMBO journal, 1995. **14**(6): p. 1136-44.
 67. Maclaine, N.J. and T.R. Hupp, *The regulation of p53 by phosphorylation: a model for how distinct signals integrate into the p53 pathway*. Aging, 2009. **1**(5): p. 490-502.
 68. Di Leonardo, A., et al., *DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts*. Genes & development, 1994. **8**(21): p. 2540-51.
 69. Liu, W., et al., *LYG-202 inhibits the proliferation of human colorectal carcinoma HCT-116 cells through induction of G1/S cell cycle arrest and apoptosis via p53 and p21(WAF1/Cip1) expression*. Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire, 2011. **89**(3): p. 287-98.
 70. Lacroix, M., R.A. Toillon, and G. Leclercq, *p53 and breast cancer, an update*. Endocrine-related cancer, 2006. **13**(2): p. 293-325.
 71. National Insitute of Health, U., *the p53 tumor suppressor protein*, 2011, NCBI.
 72. Barrett, M.T., et al., *Evolution of neoplastic cell lineages in Barrett oesophagus*. Nature genetics, 1999. **22**(1): p. 106-9.
 73. Srivastava, S., et al., *Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome*. Nature, 1990. **348**(6303): p. 747-9.
 74. Strong, L.C., M. Stine, and T.L. Norsted, *Cancer in survivors of childhood soft tissue sarcoma and their relatives*. Journal of the National Cancer Institute, 1987. **79**(6): p. 1213-20.
 75. Nichols, K.E., et al., *Germ-line p53 mutations predispose to a wide spectrum of early-onset cancers*. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology, 2001. **10**(2): p. 83-7.
 76. O'Connell, M.J., M.J. Krien, and T. Hunter, *Never say never. The NIMA-related protein kinases in mitotic control*. Trends in cell biology, 2003. **13**(5): p. 221-8.
 77. Pelegri, A.L., et al., *Nek1 silencing slows down DNA repair and blocks DNA damage-induced cell cycle arrest*. Mutagenesis, 2010. **25**(5): p. 447-54.
 78. Letwin, K., et al., *A mammalian dual specificity protein kinase, Nek1, is related to the NIMA cell cycle regulator and highly expressed in meiotic germ cells*. The EMBO journal, 1992. **11**(10): p. 3521-31.

-
79. Oakley, B.R. and N.R. Morris, *A mutation in Aspergillus nidulans that blocks the transition from interphase to prophase*. The Journal of cell biology, 1983. **96**(4): p. 1155-8.
 80. Osmani, A.H., et al., *Activation of the nimA protein kinase plays a unique role during mitosis that cannot be bypassed by absence of the bimE checkpoint*. The EMBO journal, 1991. **10**(9): p. 2669-79.
 81. Osmani, S.A., et al., *Spindle formation and chromatin condensation in cells blocked at interphase by mutation of a negative cell cycle control gene*. Cell, 1988. **52**(2): p. 241-51.
 82. Schultz, L.B., et al., *p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks*. The Journal of cell biology, 2000. **151**(7): p. 1381-90.
 83. Zhong, Q., et al., *Association of BRCA1 with the hRad50-hMre11-p95 complex and the DNA damage response*. Science, 1999. **285**(5428): p. 747-50.
 84. Polci, R., et al., *NIMA-related protein kinase 1 is involved early in the ionizing radiation-induced DNA damage response*. Cancer research, 2004. **64**(24): p. 8800-3.
 85. Chen, Y., et al., *Never-in-mitosis related kinase 1 functions in DNA damage response and checkpoint control*. Cell cycle, 2008. **7**(20): p. 3194-201.
 86. Lanza, D.C., et al., *FEZ1 interacts with CLASP2 and NEK1 through coiled-coil regions and their cellular colocalization suggests centrosomal functions and regulation by PKC*. Molecular and cellular biochemistry, 2010. **338**(1-2): p. 35-45.
 87. Chen, Y., et al., *Mutation of NIMA-related kinase 1 (NEK1) leads to chromosome instability*. Molecular cancer, 2011. **10**(1): p. 5.
 88. Chen, Y., et al., *Nek1 kinase functions in DNA damage response and checkpoint control through a pathway independent of ATM and ATR*. Cell cycle, 2011. **10**(4): p. 655-63.
 89. Chen, Y., W.J. Craigen, and D.J. Riley, *Nek1 regulates cell death and mitochondrial membrane permeability through phosphorylation of VDAC1*. Cell cycle, 2009. **8**(2): p. 257-67.
 90. Shoshan-Barmatz, V., et al., *Apoptosis is regulated by the VDAC1 N-terminal region and by VDAC oligomerization: release of cytochrome c, AIF and Smac/Diablo*. Biochimica et biophysica acta, 2010. **1797**(6-7): p. 1281-91.
 91. Shoshan-Barmatz, V., et al., *VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death*. Molecular aspects of medicine, 2010. **31**(3): p. 227-85.
 92. Chen, Y., et al., *Phosphorylation by Nek1 regulates opening and closing of voltage dependent anion channel 1*. Biochemical and biophysical research communications, 2010. **394**(3): p. 798-803.
 93. Chang, L. and M. Karin, *Mammalian MAP kinase signalling cascades*. Nature, 2001. **410**(6824): p. 37-40.

94. Gabai, V.L., et al., *Hsp72-mediated suppression of c-Jun N-terminal kinase is implicated in development of tolerance to caspase-independent cell death*. Molecular and cellular biology, 2000. **20**(18): p. 6826-36.
95. Abrieu, A., M. Doree, and D. Fisher, *The interplay between cyclin-B-Cdc2 kinase (MPF) and MAP kinase during maturation of oocytes*. Journal of cell science, 2001. **114**(Pt 2): p. 257-67.
96. Meloche, S. and J. Pouyssegur, *The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition*. Oncogene, 2007. **26**(22): p. 3227-39.
97. Garnett, M.J. and R. Marais, *Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene*. Cancer cell, 2004. **6**(4): p. 313-9.
98. Zhu, J.H., et al., *Localization of phosphorylated ERK/MAP kinases to mitochondria and autophagosomes in Lewy body diseases*. Brain pathology, 2003. **13**(4): p. 473-81.
99. Kulich, S.M., et al., *6-Hydroxydopamine induces mitochondrial ERK activation*. Free radical biology & medicine, 2007. **43**(3): p. 372-83.
100. Okita, N., et al., *Bacterial production of recombinant human poly(ADP-ribose) glycohydrolase*. Protein expression and purification, 2011. **75**(2): p. 230-5.
101. Kim, M.Y., et al., *NAD⁺-dependent modulation of chromatin structure and transcription by nucleosome binding properties of PARP-1*. Cell, 2004. **119**(6): p. 803-14.
102. Slattery, E., et al., *Purification and analysis of a factor which suppresses nick-induced transcription by RNA polymerase II and its identity with poly(ADP-ribose) polymerase*. The Journal of biological chemistry, 1983. **258**(9): p. 5955-9.
103. Oei, S.L., J. Griesenbeck, and M. Schweiger, *The role of poly(ADP-ribosyl)ation*. Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology, 1997. **131**: p. 127-73.
104. Oei, S.L., et al., *A novel function of poly(ADP-ribosyl)ation: silencing of RNA polymerase II-dependent transcription*. Biochemistry, 1998. **37**(6): p. 1465-9.
105. Hassa, P.O. and M.O. Hottiger, *The functional role of poly(ADP-ribose)polymerase 1 as novel coactivator of NF-kappaB in inflammatory disorders*. Cellular and molecular life sciences : CMLS, 2002. **59**(9): p. 1534-53.
106. Schreiber, V., et al., *Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule*. Nature reviews. Molecular cell biology, 2006. **7**(7): p. 517-28.
107. Putt, K.S. and P.J. Hergenrother, *A nonradiometric, high-throughput assay for poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG): application to inhibitor identification and evaluation*. Analytical biochemistry, 2004. **333**(2): p. 256-64.
108. Burkle, A., *Poly(ADP-ribose). The most elaborate metabolite of NAD⁺*. The FEBS journal, 2005. **272**(18): p. 4576-89.
109. Burkle, A., *DNA repair and PARP in aging*. Free radical research, 2006. **40**(12): p. 1295-302.

-
110. Beneke, S. and A. Burkle, *Poly(ADP-ribosyl)ation in mammalian ageing*. Nucleic acids research, 2007. **35**(22): p. 7456-65.
 111. Haince, J.F., et al., *Dynamic relocation of poly(ADP-ribose) glycohydrolase isoforms during radiation-induced DNA damage*. Biochimica et biophysica acta, 2006. **1763**(2): p. 226-37.
 112. Fisher, A.E., et al., *Poly(ADP-ribose) polymerase 1 accelerates single-strand break repair in concert with poly(ADP-ribose) glycohydrolase*. Molecular and cellular biology, 2007. **27**(15): p. 5597-605.
 113. Masutani, M., H. Nakagama, and T. Sugimura, *Poly(ADP-ribose) and carcinogenesis*. Genes, chromosomes & cancer, 2003. **38**(4): p. 339-48.
 114. Koh, D.W., et al., *Failure to degrade poly(ADP-ribose) causes increased sensitivity to cytotoxicity and early embryonic lethality*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(51): p. 17699-704.
 115. Hanai, S., et al., *Loss of poly(ADP-ribose) glycohydrolase causes progressive neurodegeneration in Drosophila melanogaster*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(1): p. 82-6.
 116. Ritossa, F., *A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila*. Cell Mol Life Sci 1962. **18**: p. 571-3.
 117. Ravagnan, L., et al., *Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor*. Nature cell biology, 2001. **3**(9): p. 839-43.
 118. Kim, L.S. and J.H. Kim, *Heat shock protein as molecular targets for breast cancer therapeutics*. Journal of breast cancer, 2011. **14**(3): p. 167-74.
 119. Hartl, F.U. and M. Hayer-Hartl, *Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein*. Science, 2002. **295**(5561): p. 1852-8.
 120. Jakob, U., et al., *Small heat shock proteins are molecular chaperones*. The Journal of biological chemistry, 1993. **268**(3): p. 1517-20.
 121. Ritossa, F., *Discovery of the heat shock response*. Cell stress & chaperones, 1996. **1**(2): p. 97-8.
 122. Wang, H.H., et al., *Recent advances in heat shock protein-based cancer vaccines*. Hepatobiliary & pancreatic diseases international : HBPD INT, 2006. **5**(1): p. 22-7.
 123. Wu, C., *Heat shock transcription factors: structure and regulation*. Annual review of cell and developmental biology, 1995. **11**: p. 441-69.
 124. Lindquist, S. and E.A. Craig, *The heat-shock proteins*. Annual review of genetics, 1988. **22**: p. 631-77.
 125. Dai, C., et al., *Heat shock factor 1 is a powerful multifaceted modifier of carcinogenesis*. Cell, 2007. **130**(6): p. 1005-18.
 126. Min, J.N., et al., *Selective suppression of lymphomas by functional loss of Hsf1 in a p53-deficient mouse model for spontaneous tumors*. Oncogene, 2007. **26**(35): p. 5086-97.

-
127. Mori-Iwamoto, S., et al., *Proteomics finding heat shock protein 27 as a biomarker for resistance of pancreatic cancer cells to gemcitabine*. International journal of oncology, 2007. **31**(6): p. 1345-50.
 128. Gabai, V.L., K.R. Budagova, and M.Y. Sherman, *Increased expression of the major heat shock protein Hsp72 in human prostate carcinoma cells is dispensable for their viability but confers resistance to a variety of anticancer agents*. Oncogene, 2005. **24**(20): p. 3328-38.
 129. Pandey, P., et al., *Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90*. The EMBO journal, 2000. **19**(16): p. 4310-22.
 130. Eells, J.T., et al., *Mitochondrial signal transduction in accelerated wound and retinal healing by near-infrared light therapy*. Mitochondrion, 2004. **4**(5-6): p. 559-67.
 131. Ying, R., et al., *Pretreatment with near-infrared light via light-emitting diode provides added benefit against rotenone- and MPP+-induced neurotoxicity*. Brain research, 2008. **1243**: p. 167-73.
 132. Oncology, B.o.t.F.o.C., *Radiotherapy Dose-Fractionation* 2006, London: Royal College of Radiologists.
 133. Schroeder, P., et al., *Photoprotection beyond ultraviolet radiation--effective sun protection has to include protection against infrared A radiation-induced skin damage*. Skin Pharmacol Physiol, 2010. **23**(1): p. 15-7.
 134. van den Berg, T.J. and H. Spekrijse, *Near infrared light absorption in the human eye media*. Vision Res, 1997. **37**(2): p. 249-53.
 135. Chae, S., et al., *Centrosome amplification and multinuclear phenotypes are Induced by hydrogen peroxide*. Exp Mol Med, 2005. **37**(5): p. 482-7.
 136. Kaufmann, B.P., A. Hollaender, and H. Gay, *Modification of the Frequency of Chromosomal Rearrangements Induced by X-Rays in Drosophila. I. Use of near Infrared Radiation*. Genetics, 1946. **31**(4): p. 349-67.
 137. Swanson, C.P. and H.T. Yost, *The Induction of Activated, Stable States in the Chromosomes of Tradescantia by Infra-red and X-Rays*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1951. **37**(12): p. 796-802.
 138. Yost, H.T., Jr., *The frequency of x-ray induced chromosome aberrations in Tradescantia as modified by near infrared radiation*. Genetics, 1951. **36**(2): p. 176-84.
 139. Yost, H.T., *The Effect of Intensity of Infrared on X-Ray Induced Chromosome Aberrations in Tradescantia*. Genetics, 1952. **37**(5): p. 457-68.
 140. Young, W.J., et al., *The Effect of Pretreatment with Infra-Red Radiation on the X-ray Induced Sex-Linked Recessive Lethal and Visible Mutation Rate in Drosophila Melanogaster*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1953. **39**(6): p. 488-95.

-
141. Withrow, R.B. and C.C. Moh, *Nonionizing radiant energy as an agent in altering the incidence of x-ray-induced chromatid aberrations. I. Effects of far-red and infrared radiant energy on Tradescantia and Vicia*. Radiat Res, 1957. **6**(4): p. 491-500.
 142. Atmospheric Science Data Center, N., *Surface meteorology and Solar Energy, A renewable energy resource web site (release 6.0);* , 2011.
 143. Chan, M.P., et al., *Salvage external beam radiotherapy after failed primary chemotherapy for bilateral retinoblastoma: rate of eye and vision preservation*. Br J Ophthalmol, 2009. **93**(7): p. 891-4.
 144. Shields, C.L. and J.A. Shields, *Diagnosis and management of retinoblastoma*. Cancer Control, 2004. **11**(5): p. 317-27.
 145. Mackey, M.A. and F. Ianzini, *Enhancement of radiation-induced mitotic catastrophe by moderate hyperthermia*. Int J Radiat Biol, 2000. **76**(2): p. 273-80.
 146. Vakifahmetoglu, H., M. Olsson, and B. Zhivotovsky, *Death through a tragedy: mitotic catastrophe*. Cell Death Differ, 2008. **15**(7): p. 1153-62.
 147. Erenpreisa, J., et al., *The role of meiotic cohesin REC8 in chromosome segregation in gamma irradiation-induced endopolyploid tumour cells*. Exp Cell Res, 2009. **315**(15): p. 2593-603.
 148. Zouboulis, C.C., et al., *Human skin stem cells and the ageing process*. Experimental gerontology, 2008. **43**(11): p. 986-97.
 149. Indovina, P., G. Rainaldi, and M.T. Santini, *Three-dimensional cell organization leads to a different type of ionizing radiation-induced cell death: MG-63 monolayer cells undergo mitotic catastrophe while spheroids die of apoptosis*. Int J Oncol, 2007. **31**(6): p. 1473-83.
 150. Piazena, H. and D.K. Kelleher, *Effects of infrared-A irradiation on skin: discrepancies in published data highlight the need for an exact consideration of physical and photobiological laws and appropriate experimental settings*. Photochem Photobiol, 2010. **86**(3): p. 687-705.
 151. Sommer, A.P., et al., *Biostimulatory windows in low-intensity laser activation: lasers, scanners, and NASA's light-emitting diode array system*. J Clin Laser Med Surg, 2001. **19**(1): p. 29-33.
 152. Jeggo, P.A. and M. Lobrich, *Contribution of DNA repair and cell cycle checkpoint arrest to the maintenance of genomic stability*. DNA Repair (Amst), 2006. **5**(9-10): p. 1192-8.
 153. Li, L. and L. Zou, *Sensing, signaling, and responding to DNA damage: organization of the checkpoint pathways in mammalian cells*. J Cell Biochem, 2005. **94**(2): p. 298-306.
 154. van Gent, D.C., J.H. Hoeijmakers, and R. Kanaar, *Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection*. Nat Rev Genet, 2001. **2**(3): p. 196-206.
 155. Wahl, G.M. and A.M. Carr, *The evolution of diverse biological responses to DNA damage: insights from yeast and p53*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(12): p. E277-86.

-
156. Zhou, B.B. and S.J. Elledge, *The DNA damage response: putting checkpoints in perspective*. Nature, 2000. **408**(6811): p. 433-9.
 157. Deckbar, D., et al., *The limitations of the G1-S checkpoint*. Cancer Res, 2010. **70**(11): p. 4412-21.
 158. Barzilai, A. and K.I. Yamamoto, *DNA damage responses to oxidative stress*. DNA Repair, 2004. **3**(8-9): p. 1109-1115.
 159. Vilenchik, M.M. and A.G. Knudson, *Endogenous DNA double-strand breaks: Production, fidelity of repair, and induction of cancer*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(22): p. 12871-12876.
 160. Khaitan, D. and B.S. Dwarakanath, *Endogenous and induced oxidative stress in multi-cellular tumour spheroids: implications for improving tumour therapy*. Indian J Biochem Biophys, 2009. **46**(1): p. 16-24.
 161. Heselich, A., et al., *Near-infrared Exposure Changes Cellular Responses to Ionizing Radiation*. Photochemistry and photobiology, 2011.
 162. Bradley, M.O. and K.W. Kohn, *X-ray induced DNA double strand break production and repair in mammalian cells as measured by neutral filter elution*. Nucleic Acids Res, 1979. **7**(3): p. 793-804.
 163. Bernstein, N.K., et al., *The molecular architecture of the mammalian DNA repair enzyme, polynucleotide kinase*. Mol Cell, 2005. **17**(5): p. 657-70.
 164. Henrie, M.S., et al., *Lethality in PARP-1/Ku80 double mutant mice reveals physiological synergy during early embryogenesis*. DNA Repair (Amst), 2003. **2**(2): p. 151-8.
 165. Levy, N., et al., *XRCC1 is phosphorylated by DNA-dependent protein kinase in response to DNA damage*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(1): p. 32-41.
 166. Strom, C.E., et al., *Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) is not involved in base excision repair but PARP inhibition traps a single-strand intermediate*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(8): p. 3166-75.
 167. Toulany, M., et al., *PI3K-Akt signaling regulates basal, but MAP-kinase signaling regulates radiation-induced XRCC1 expression in human tumor cells in vitro*. DNA Repair (Amst), 2008. **7**(10): p. 1746-56.
 168. Rello-Varona, S., et al., *Mitotic catastrophe induced in HeLa cells by photodynamic treatment with Zn(II)-phthalocyanine*. Int J Oncol, 2008. **32**(6): p. 1189-96.
 169. Karu, T.I., *Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by red and near-IR radiation*. Photochem Photobiol, 2008. **84**(5): p. 1091-9.
 170. Agnello, M., G. Morici, and A.M. Rinaldi, *A method for measuring mitochondrial mass and activity*. Cytotechnology, 2008. **56**(3): p. 145-9.
 171. Shen, X.H., et al., *Hyperglycemia reduces mitochondrial content and glucose transporter expression in mouse embryos developing in vitro*. J Reprod Dev, 2009. **55**(5): p. 534-41.

-
172. Pendergrass, W., N. Wolf, and M. Poot, *Efficacy of MitoTracker Green and CMXRosamine to measure changes in mitochondrial membrane potentials in living cells and tissues*. Cytometry A, 2004. **61**(2): p. 162-9.
 173. Dayal, D., et al., *Mitochondrial complex II dysfunction can contribute significantly to genomic instability after exposure to ionizing radiation*. Radiat Res, 2009. **172**(6): p. 737-45.
 174. Limoli, C.L., et al., *Persistent oxidative stress in chromosomally unstable cells*. Cancer Res, 2003. **63**(12): p. 3107-11.
 175. Zhang, Y., et al., *cDNA microarray analysis of gene expression profiles in human fibroblast cells irradiated with red light*. J Invest Dermatol, 2003. **120**(5): p. 849-57.
 176. Rajendran, S., et al., *The Role of Mitochondria in the Radiation-Induced Bystander Effect in Human Lymphoblastoid Cells*. Radiat Res, 2010.
 177. Du, C., et al., *Mitochondrial ROS and radiation induced transformation in mouse embryonic fibroblasts*. Cancer Biol Ther, 2009. **8**(20): p. 1962-71.
 178. Gao, Z., et al., *Late ROS accumulation and radiosensitivity in SOD1-overexpressing human glioma cells*. Free Radic Biol Med, 2008. **45**(11): p. 1501-9.
 179. Kaufmann, B.P. and K. Wilson, *Modification of the Frequency of Chromosomal Rearrangements Induced by X-Rays in Drosophila. IV. Posttreatment with near Infrared Radiation*. Genetics, 1949. **34**(4): p. 425-36.
 180. Glass, B. and H.L. Plaine, *The immediate dependence of the action of a specific gene in Drosophila melanogaster upon fertilization*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1950. **36**(11): p. 627-34.
 181. Swanson, C.P., *Further Studies on the Effect of Infra-Red Radiation on X-Ray-Induced Chromatid Aberrations in Tradescantia*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1949. **35**(5): p. 237-44.
 182. Schmidtke, L., *Einfluss nicht-ionisierender naher Infrarotstrahlung auf strahleninduzierte Zell-Zell-Kommunikation und damit einhergehende Zellzyklusregulation*, in *Faculty for Biology, Department of Developmental Biology and Neurogenetics* 2011, Technical University: Darmstadt.
 183. Fei, P. and W.S. El-Deiry, *P53 and radiation responses*. Oncogene, 2003. **22**(37): p. 5774-83.
 184. Murphy, K.L., A.P. Dennis, and J.M. Rosen, *A gain of function p53 mutant promotes both genomic instability and cell survival in a novel p53-null mammary epithelial cell model*. Faseb J, 2000. **14**(14): p. 2291-302.
 185. Wang, X.J., et al., *Expression of a p53 mutant in the epidermis of transgenic mice accelerates chemical carcinogenesis*. Oncogene, 1998. **17**(1): p. 35-45.
 186. Caulin, C., et al., *An inducible mouse model for skin cancer reveals distinct roles for gain- and loss-of-function p53 mutations*. J Clin Invest, 2007. **117**(7): p. 1893-901.

-
187. Wei, R.L. and Y. Chen, *Overexpression of Nek1 in Renal Cell Carcinoma Protects Against Cell Death from Ionizing Radiation*, in *ASTRO2011*2011, American Society for Radiation Oncology.
 188. Tulin, A., et al., *Drosophila poly(ADP-ribose) glycohydrolase mediates chromatin structure and SIR2-dependent silencing*. Genetics, 2006. **172**(1): p. 363-71.
 189. Blenn, C., F.R. Althaus, and M. Malanga, *Poly(ADP-ribose) glycohydrolase silencing protects against H2O2-induced cell death*. The Biochemical journal, 2006. **396**(3): p. 419-29.
 190. Peralta-Leal, A., et al., *PARP inhibitors: new partners in the therapy of cancer and inflammatory diseases*. Free radical biology & medicine, 2009. **47**(1): p. 13-26.
 191. Haghdoost, S., et al., *Can 8-oxo-dG be used as a predictor for individual radiosensitivity?* International journal of radiation oncology, biology, physics, 2001. **50**(2): p. 405-10.
 192. Guyton, K.Z., et al., *Activation of mitogen-activated protein kinase by H2O2. Role in cell survival following oxidant injury*. The Journal of biological chemistry, 1996. **271**(8): p. 4138-42.
 193. Westmeier, D., *Untersuchung des Einflusses von NIR auf den MAPK-Signalweg*, in *Faculty for Biology, Department of Developmental Biology and Neurogenetics*2011, Technical University: Darmstadt.
 194. Shi, Y., *Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure*. Cell, 2009. **139**(3): p. 468-84.
 195. Theodosiou, A. and A. Ashworth, *MAP kinase phosphatases*. Genome biology, 2002. **3**(7): p. REVIEWS3009.
 196. Yan, X., et al., *Human Nudel and NudE as regulators of cytoplasmic dynein in poleward protein transport along the mitotic spindle*. Molecular and cellular biology, 2003. **23**(4): p. 1239-50.
 197. Chowdhury, D., et al., *gamma-H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair*. Molecular cell, 2005. **20**(5): p. 801-9.
 198. Nakada, S., et al., *PP4 is a gamma H2AX phosphatase required for recovery from the DNA damage checkpoint*. EMBO reports, 2008. **9**(10): p. 1019-26.
 199. Opsahl, H. and E. Rivedal, *Quantitative determination of gap junction intercellular communication by scrape loading and image analysis*. Cell adhesion and communication, 2000. **7**(5): p. 367-75.

Publikationsliste

Publikationen aus dieser Arbeit

- 11 / 2011 Heselich, A, Frohns, F, Frohns, A, Naumann, SC and Layer, PG
 „Near-infrared Exposure Changes Cellular Responses to Ionizing Radiation“ Photochemistry and Photobiology, 2011. (Epub ahead of print; doi: 10.1111/j.1751-1097.2011.01031.x)
- 09 / 2011 Posterbeitrag zur 14. Jahrestagung der Gesellschaft für biologische Strahlenforschung (GBS), Köln
 „Effects on Non-ionizing Near Infrared on Cellular Responses to Ionizing X-radiation“

weitere Posterbeiträge zu Tagungen

- 10 / 2008 Posterbeitrag zum 15th International Congress on In Vitro Toxicology, ESTIV 2008, Stockholm
 „Image Analysis Approach for the Application of Embryonic Stem Cell-Derived Myocardial Tissue in Cardiotoxicity Testing“
- 09 / 2007 Posterbeitrag zur 23. GUM Tagung im Rahmen der 37. EEMS-Tagung 2007, Basel/Schweiz
 „Aneugenic compounds increase micronucleus frequencies in mononucleated cells in the CB micronucleus test“
- 10 / 2007 Posterbeitrag zur Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Stammzellforschung, Würzburg
 „Studies on improving the Embryonic Stem Cell Test for an assessment of neuroembryotoxic effects“

weitere Publikationen in Vorbereitung

- 12 / 2011 Waldmann, P, Bohnenberger, S, Greinert, R, Hermann-Then, B, Heselich, A, Klug, S, König, J, Kuhr, K, Kuster, N, Murbach, M, Merker, M, Pollet, D, Schadenböck, W, Scheidemann-Wesp, U, Schwab, B, Volkmer, B, Weyer, V and Blettner, M.
 „Influence of GSM Signals on Human Peripheral Lymphocytes: Genotoxicity“ Radiation Research (submitted)
- n.a. Heselich, A, Schmidtke, L, Frohns, F and Layer, PG
 „Near-infrared Exposure Changes Cell-Cell-Communication via Gap Junctions After Ionizing Radiation“ (Manuscript in preparation)

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Anja Heselich
Familienstand: verheiratet
Kinder: 1
Nationalität: deutsch
geboren am 14.05.1980 in Karl-Marx-Stadt

Ausbildung

- 02 / 2009 – 01 / 2012 Anfertigung der Dissertation „Einfluss naher Infrarotstrahlung auf die durch ionisierende Strahlung induzierten zellulären Veränderungen“ unter Anleitung von Prof. Dr. Paul G. Layer am Institut für Zoologie der Technischen Universität Darmstadt
- 09 / 1998 - 08 / 2004 Studium der Chemischen Technologie mit Schwerpunkt Biotechnologie am Fachbereich Chemie- und Biotechnologie der Hochschule Darmstadt
- Abschluss: Dipl.-Ing. chemische Technologie, Schwerpunkt Biotechnologie (FH)
- 04 - 08 / 2004 Diplomarbeit „Isolierung, Charakterisierung und Klonierung eines Multicopper Oxidase-Gens aus *Arthrobacter sp. RS5*“
- 09 - 12 / 2001 Berufspraktisches Semester Teil 1: F+E-Projekt „Biomass gasification and combustion“
- ReaTech, Roskilde (Dänemark)
- 01 - 03 / 2002 Berufspraktisches Semester Teil 2: „Prozessmanagement-Projekt: Optimierung von Gefahrgutlagerung und –transport sowie Analyse der Radioaktiventsorgung“
- Merck KGaA, Darmstadt
- 1996 - 2008 Fachoberschule Aschaffenburg, Fachabitur für Verwaltung, Wirtschaft und Rechtspflege

Beruflicher Werdegang

- 02 / 2009 – 01 / 2012 Wissenschaftliche Mitarbeiterin (Promotion) im Fachbereich Biologie an der Technischen Universität Darmstadt mit den Schwerpunkt auf den „Einfluss von nicht-ionisierender Strahlung auf die Induktion von Schadensantworten ionisierender Strahlung auf diverse Zellkultursysteme “
- 02 / 2007 – 01 / 2009 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Auftragsforschungsvorhaben des Bundesamts für Strahlenschutz „Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut - Gentoxizität“ (FM 8823)

09 / 2004 - 08 / 2006 Laboringenieur im Bereich der Bioverfahrenstechnik /
Verfahrenstechnik
Hochschule Darmstadt, Fachbereich Chemie- und Biotechnologie

Weiterbildung

10-11 / 2006 Hospitation an der GSI Darmstadt, Abteilung Biophysik
(Chromosomenaberrationen und Sister Chromatid Exchange)

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und noch nicht veröffentlicht.

Darmstadt, den 27. November 2011